

JP2003199564A

Publication Title:

METHOD AND COMPOSITION FOR CHROMOSOME-SPECIFIC STAINING

Abstract:

Abstract of JP 2003199564

(A) Translate this text PROBLEM TO BE SOLVED: To simultaneously detect genetic rearrangements of multiple loci when detecting chromosome abnormality. ; SOLUTION: In situ hybridization is carried out by using a high complexity nucleic acid probes comprising a mixture of labeled heterogeneous nucleic fragments which are complementary to loci of target chromosomes in a region containing suspicious genetic rearrangements to detect contiguous gene syndromes. The nucleic acid probes comprise sequences which are substantially homologous to nucleic sequence exhibiting characteristics of a plurality of components of a contiguous gene syndromes. Acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic myelogenous leukemia (CML) and Down syndrome are detected as suspicious genetic abnormalities. ; COPYRIGHT: (C)2003,JPO

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-199564

(P2003-199564A)

(43) 公開日 平成15年7月15日 (2003.7.15)

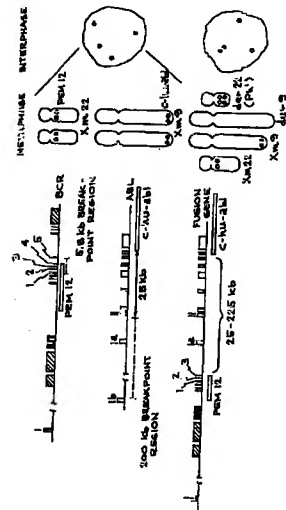
(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	キーワード* (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 6
C 1 2 Q 1/68		C 0 1 N 33/48	P 4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/48		33/50	P 4 B 0 6 3
33/50		33/53	M
33/53		33/566	
審査請求 有 請求項の数11 O L (全 51 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2002-337236(P2002-337236)	(71) 出願人	592110646
(62) 分割の表示	特願2-220946の分割		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブカリフォルニア
(22) 出願日	平成12年8月21日 (1990.8.21)		THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIF ORNIA
(31) 優先権主張番号	4 4 4, 6 6 9		アメリカ合衆国 カリフォルニア州
(32) 優先日	平成11年12月1日 (1989.12.1)		94612 オークランド トゥエンティセカ ンドフロア レイクサイドドライブ 300
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100064724
(31) 優先権主張番号	4 9 7, 0 9 8		弁理士 長谷 照一
(32) 優先日	平成12年3月20日 (1990.3.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 染色体-特異的染色の方法および組成物

(57) 【要約】

【課題】 染色体異常を検出するに当たり、複数の座の遺伝子再配列を同時に検出する。

【解決手段】 各疑わしい遺伝子再配列を含む領域における標的染色体物質の座位に各々が相補的である標識された異種の核酸断片の混合物からなる高度コンプレキシシティ核酸プローブを使用して、インシトゥハイブリダイゼーションを行い、隣接する遺伝子症候群を検出する。核酸プローブは、隣接する遺伝子症候群の複数の成分の特性を示す核酸配列に実質的に相同である配列からなる。疑わしい遺伝学的異常としては、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病(CML)、ダウン症候群が検出される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】急性リンパ性白血病(ALL)に特徴的な遺伝子再配列を有すると疑わしい標的染色体物質における前記疑わしい遺伝子再配列を含む領域の座位に各々が相補的である標識された核酸断片の不均一混合物からなり、前記標的染色体物質にハイブリダイズさせることにより、前記各遺伝子再配列をそれぞれ識別して検出することを可能とする標的染色体物質の染色に使用する核酸プローブ。

【請求項2】高度コンプレキシティ核酸プローブでインシットゥ ハイブリダイゼーションを行うことからなり、ゲノムにおける比較的近接するプロキシミティ(close proximity)に生じる疑わしい遺伝子再配列を識別する方法であって、同プローブは疑わしい遺伝子再配列を含む領域における核酸配列に実質的に相同である配列を含む識別方法。

【請求項3】請求項2に記載の方法において、前記疑わしい遺伝子再配列がCMLまたはALLに関連することを特徴とする識別方法。

【請求項4】高度コンプレキシティ核酸プローブのインシットゥ ハイブリダイゼーションからなる隣接する遺伝子症候群を検出する方法であり、同プローブは隣接する遺伝子症候群の1または複数の成分の特性を示す核酸配列に実質的に相同である配列からなる検出方法。

【請求項5】請求項4に記載の検出方法において、前記隣接遺伝子症候群はダウン症候群であることを特徴とする検出方法。

【請求項6】細胞遺伝学的には類似するが遺伝学的には相違する疾病に関連する切断点間に部分的または全体にわたって側面に位置し、および/または延びる染色体領域における核酸配列に実質的に相同である核酸配列からなる請求項1に記載の核酸プローブ。

【請求項7】下記により調製された染色体-特異的染色試薬の前記ゲノムに対するインシットゥ ハイブリダイゼーションからなり、異常物を含む慣用のバンド分析により表示されるゲノムの染色体領域における1または複数の遺伝子再配列を検査する方法。

(a) 前記染色体領域から染色体-特異的DNAを分離すること。

(b) 分離された染色体-特異的DNAのピースを増幅すること。

(c) 標的染色体領域に優先的にハイブリダイズする核酸断片の集合物を形成するために、分離されたDNAの増幅されたピースに含まれている共有反復配列のハイブリダイゼーション能力を無能力化し、および/または同共有反復配列を除去すること、および標識された核酸断片の不均一混合物を形成するために核酸断片集合物を標識すること。

【請求項8】核酸プローブを使用する核酸配列を基礎とした染色体物質を染色する方法であって、前記染色体物質

は1または複数の中期および/または間期染色体、またはそれらの1または複数の領域であり、母性血液から分離された胎児細胞からなる染色体物質の染色方法。

【請求項9】標識された一重鎖核酸断片の不均一混合物からなる染色体-特異的染色試薬であり、当該染色体-特異的染色試薬において前記標識された核酸断片は標的染色体物質の座位に相補的であり、非標的染色体物質の座位に対するハイブリダイゼーション能力を有する核酸配列を実質的に含まないことを特徴とする染色体-特異的染色試薬。

【請求項10】下記のステップからなる染色体中の細胞学的異常を検出する方法。

(a) 2またはそれ以上の染色されたバンドのパターンを形成するために、遺伝学的異常を含んでいる疑わしいゲノムの2またはそれ以上の染色体領域に標識された高度コンプレキシティ標識化/可視化核酸プローブをハイブリダイズすること。

(b) ステップ(a)にて形成されたバンディングパターンを、異常を含む疑いのある同種の正常な染色体物質に前記プローブをハイブリダイズすることにより得られたバンディングパターンと比較すること。

(c) ステップ(a)にて形成されたバンディングパターンと正常なバンディングパターン間の差異を検出すること。

【請求項11】請求項10に記載の細胞学的異常を検出する方法において、バンディングパターンは2つの染色領域からなり、疑わしい遺伝学的異常は慢性骨髄性白血病(CML)に関連する遺伝子再配列であることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般的に細胞遺伝学の分野、より詳細には分子細胞遺伝学に関する。本発明は、染色体を同定し分類する方法に関する。なおより詳細には、本発明は、以下に記載するプロセスによって設計することができる核酸プローブに関し、これにより1または複数の全染色体にわたり、および/または1または複数の染色体上の1または複数の領域にわたる染色分布を作出し、かつこれには全ゲノムに及ぶ染色パターンも含まれる。染色パターンは、とりわけ出生前、腫瘍および疾患に関連した細胞遺伝学の適用を含む所望のいずれの細胞遺伝学的適用に対しても適合させることができる。本発明は、核酸プローブの組成物および染色体を染色する方法を提供し、これによって中期スプレッド(spread)と同期核の正常染色体および染色体異常を同定する。本発明のプローブ作出-染色パターンは、正常染色体、異常染色体の顕微鏡的および/またはフローサイトメトリーによる同定ならびに特定の異常の遺伝学的性質の解析を容易にする。

【0002】ここに記載した例の多くはヒト染色体に関

し、またここに使用した言葉の多くはヒト関係に向けられているが、染色体を染色または着色するために核酸プローブを用いるという概念は、植物と動物の両者を含むいずれの源からの染色体にも適用できる。

【0003】

【従来の技術】染色体異常は、遺伝性疾患、変性疾患、および変性疾患を起こすことが知られている薬剤への暴露、特に癌と関連がある。German, 「Studying Human Chromosomes Today」, American Scientist, Vol. 58, pp. 182-201 (1970); Yunis, 「The Chromosomal Basis of Human Neoplasia」, Science, Vol. 221, pp. 227-236 (1983); および German, 「Clinical Implication of Chromosome Breakage」, in Genetic Damage in Man Caused by Environmental Agents, Berg, Ed., pp. 65-86 (Academic Press, New York, 1979) 参照のこと。染色体異常には数タイプがあり、なかでも個々に過剰または欠如のある染色体、1個の染色体の部分的過剰または欠如（セグメント的重複または欠失）、切断、環および染色体再配列を含む。染色体または遺伝子再配列は、転座（1つの染色体から他の染色体へのピースのトランスファー）、二動原体（2個の動原体を有する染色体）、逆位（染色体セグメントの極性の反転）、挿入、増幅、および欠失を含む。

【0004】検出可能な染色体異常は、ヒトの出生数250ごとに1回の頻度で起きる。染色体物質の欠失または付加を伴う異常は、生体の遺伝子の平衡を変え、普通は胎内死または重大な精神的、肉体的欠陥をもたらす。ダウン症候群は、正常の1対の染色体の代わりに3個の第21染色体のコピーを有することによって起こることがある。この症候群は、異常染色体数または異数性によって起こる状態の一例である。また、ダウン症候群は、第21染色体のサブリージョンのセグメント的重複（例えば21q22）によっても起こることがあり、これは第21または他の染色体上に存在することがある。エドワーズ症候群(18+)、パトー症候群(13+)、ターナー症候群(XO)、およびクラインフェルター症候群(XXY)が、数の異常を来す疾患のなかでよく見られるものである。[Epstein, The Consequences of Chromosome Imbalance: Principles, Mechanisms and Models (Cambridge Univ. Press 1986); Jacobs, Am. J. Epidemiol., 105: 180 (1977); および Lubs et al., Science, 169: 495 (1970)]。

【0005】網膜芽細胞腫(del 13q14)、ブレードウィリ症候群(del 15q11-q13)、ウィルムス腫瘍(del 11p13)およびクリーデュシャ症候群(Cri-du-chat) (del 5p)は、構造的異常と関連した重要な疾患の例である。[Norris and Fraser, Medical Genetics: Principles and Practice, (Lea and Febiger 1989)]。

【0006】構造的に異常な染色体、例えば二動原体であって染色体異常誘発物(clastogenic agent)、例えば電離性放射線または突然変異誘発化学物質によって引き起こされるものの頻度の測定は、このような物質によっ

て起こる遺伝子傷害の定量的指標として広く用いられる。Biochemical Indicators of Radiation Injury Manual (International Atomic Energy Agency, Vienna, 1971); および Berg Ed. Genetic Damage in Man Caused by Environmental Agents (Academic Press, New York, 1979) 参照のこと。潜在的に発癌性があり奇形腫を発生する多くの化学製品が、工業、農業活動によって環境に広く分布されている。これらの化学製品のなかには、殺虫剤およびある範囲の産業廃棄物、同副産物、例えばハロゲン化炭化水素、塩化ビニル、ベンゼン、ヒ素などがふくまれる。Kraybill et al., Eds., Environmental Cancer (Hemisphere Publishing Corporation, New York, 1977) 参照のこと。染色体切断およびその他の異常の鋭敏な測定は、このような職業的、環境的薬剤への暴露の影響を評価するための改良された線量測定による危険評価方法論の基礎を形成することができであろう。

【0007】遺伝子スクリーニングと生物学的線量測定の現在の手法は、カリオタイプ解析を含む。カリオタイプは、各個または各個の関連グループに相補的な特有な染色体であって、通常は有糸分裂中期における染色体の数と形態の両方によって定められる。これには、全染色体数、各染色体型のコピー数（例えばX染色体のコピー数）および染色体の形態（例えば長さ、動原体インデックス、連結性(connectedness)などによって測定される）のようなものが含まれる。染色体異常はカリオタイプの検査によって検出できる。カリオタイプは、従来は生体の分裂中期を染色し、またはこれとは別に濃縮した（例えば早期染色体濃縮によって）染色体によって決定されている。濃縮染色体が用いられるのは、その分散状態と核内において可視境界が無いために、中期染色体を見えるようにすることが、最近まで可能でなかったためである。

【0008】化学的染色に基づく多くの細胞学的技術が開発されたが、これらは濃縮染色体に、普通はバンドと呼ばれる縦方向のパターンを生じさせるものである。生体内の各染色体のバンディングパターンは、普通は各染色体型の不明瞭ではない同定を可能にする。Latt, 「Optical Studies of Metaphase Chromosome Organization」, Annual Review of Biophysics and Bioengineering, Vol. 5, pp. 1-37 (1976) 参照のこと。ある重要な染色体異常、例えば転座および逆位の正確な検出には、このようなバンド分析を必要とした。

【0009】あいにく、このような慣用のバンド分析は、細胞培養と高品質の中期スプレッドの調製を必要とし、これには時間と労力を要し、しかもしばしば困難または不可能である。例えば、多くの型の腫瘍からの細胞は培養が困難であり、かつ培養された細胞がもとの腫瘍細胞集団を代表しているかどうかは明確ではない。培養可能な胎児細胞は、侵襲的手段によって得ることが必要であり、また分析に十分な中期細胞を得るには数週間培

養しなければならない。多くの場合、異常染色体上のバンドニングパターンは、これを構成している正常染色体の部分の明瞭な同定を可能にするものではない。このような同定は、異常に含まれる重要な遺伝子の位置を示すために重要であろう。さらに、現在のカリオタイプニング法の感度と分解能とは、多数の染色体または染色体領域は非常に類似した染色特性を有し、かつバンドの一部分のみに含まれる異常（例えば欠失）は検出できないという事実によって制限される。したがって、このような方法は、実質的に隣接する（contiguous）遺伝子症候群、例えば部分トリソミー、ブレードウイリ症候群[Emanuel, *Am. J. Hum. Genet.*, 43:575(1988); Schmickel, *J. Pediatr.*, 109:231(1986)]および網膜芽細胞腫[Sparkes, *Biochem. Biophys. Acta.*, 780:95(1985)]の診断および詳細分析に限られる。

【0010】次の参考文献は、以下の記載において表示の番号によって示す。

1. A. de Klein et al., *Nature* 300, 765(1982)
2. J. Groffen et al., *Cell* 36, 93(1984)
3. N. Heisterkamp et al., *Nature* 306, 239(1983)
4. E. S. Htivelman et al., *Blood* 69, 971(1987)
5. J. B. Konopka, S. M. Watanabe, O. N. Witte, *Cell* 37, 1035(1984)
6. Y. Ben-Neriah et al., *Science* 233, 212(1986)
7. P. C. Nowell and D. A. Hungerford, *Science* 132, 1497(1960)
8. J. D. Rowley, *Nature* 243, 290(June 1973)
9. G. Grosveld et al., *Mol. Cell Biol.* 6, 607(1986)
10. E. Canaani et al., *Lancet* 1, 593(1984)
11. R. P. Gale and E. Canaani, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5648(1984)
12. Konopka J. B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1810(1985)
13. P. Bann et al., *Cancer Genet. Cytogenet.* 29, 1(1987)
14. S. Abe et al., *Cancer Genet. Cytogenet.* 38, 61(1989)
15. M. Shtalrid et al., *Blood* 72, 485(1988)
16. I. Dube et al., *Genes Chromosomes and Cancer* 1, 106(1989)
17. A. J. Fishleder, B. Shadrach and C. Tuttle, *Leukemia* 3:10, 746(1989)
18. C. R. Bartram et al., *J. Exp. Med.* 164(5):1389(1986)
19. S. Hiroswa et al., *Am. J. Hematol.* 28, 133(1988)
20. M. S. Lee et al., *Blood* 73(8):2165(1989)
21. E. S. Kawasaki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5698(1988)
22. M. S. Roth et al., *Blood* 74, 882(1989)
23. A. L. Hooberman et al., *Blood* 74, 1101(1989)

24. C. A. Westbrook et al., *Blood* 71(3):697-702(1988)
25. B. Trask, D. Pinkel, and G. van den Engh, *Genomics* 5, 710(1989)
26. S. J. Collins and M. T. Groudine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4813(1983)
27. D. Pinkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2934(1986)
28. D. Pinkel, T. Straume and J. W. Gay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9138(1988)
29. B. Trask and J. Hamlin, *Genes and Development*, 3:1913(1989)
30. J. B. Lawrence, C. A. Villave and R. H. Singer, *Cell* 42, 51(1988)
31. G. D. Johnson and J. G. Noguera, *J. Immunol. Methods* 43, 349(1981)
32. Hegewisch-Becker et al., *J. Cell. Biochem. (Suppl. 1)* 13E, 289(1989)
33. Kohler et al., "Expression of BCR-ABL from Transcripts Following Bone Marrow Transplant for Philadelphia Chromosome Positive Leukemias", (manuscript submitted)
34. Heisterkamp et al., *Nature*, 315:758(1985)
35. Heisterkamp et al., *J. Molec. Appl. Genet.*, 2:57(1983).

【0011】第9染色体の長い腕からのプロトオンコジーンc-ABLと第22染色体のBCR遺伝子との融合は、CMLにおける一致した所見である(1-3)。この遺伝子変化は、BCR-ABL転写の形成となり、これは翻訳されて實際上全てのCML患者に存在する210kdタンパクを形成する(4-6)。患者の90%において、融合遺伝子は、第9及び第22染色体を含み、フィラデルフィア(Ph⁺)染色体と呼ばれる細胞遺伝学的に明瞭な小さな末端動原体型染色体を生じる相互転座に由来している(7-12)(図8参照)。しかしながら、標準的細胞遺伝学においては、間隔的に密接した切断点、例えばCMLおよび急性リンパ性白血病(ALL)の特徴である切断点を識別する解像力を有せず、またより複雑な再配列によって生じた融合を見落とす。両方の遺伝子における切断点領域のマッピングとクローニングは、細胞遺伝学的にPh⁺染色体が検出できなかったCML患者のBCR-ABL融合を立証することができる分子技術を生むこととなった(13-16)。BCR再配列に対するサザン分析は、CMLの診断に対する標準となった。さらに最近になって、融合は、逆転写酵素を用いたCML mRNAからコピーされたcDNAのインビトロ増幅によって検出されるようになった(17-23)。この技術は、低い頻度で現れるCML細胞からのBCR-ABL転写の検出を可能にする。これら両技術は、細胞集団から得られた核酸を利用するので、各個の細胞に対する遺伝子型と表現型との相関はあり得ない。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】前記のように、慣用のバンド分析には幾つかの重要な制限があり、そのなかには以下の事項が含まれる。1) 労力と時間がかかり、かつ高度に訓練された分析化学者を必要とする。2) 濃縮染色体にしか適用できない。3) 異常の性質とバンディング技術の分解能によって、3-15メガベース(Mb)以下を含む構造的異常の検出には向けられない。[Landegren et al., Science, 242:229(1988)] 本発明は、慣用のバンド分析の上記制限を克服するためにプローブ組成物と方法を提供する。

【0013】従来技術による化学的染色手法は、よく分からない理由でゲノム上にパターンを作るが、これは異なった適用での使用に対する要求に応じて変えることができない。このような化学的染色パターンは、プローブの結合座位をマップ化するために用いられた。しかしながら、インシットゥハイブリダイゼーションは、時たまに、しかも大きな努力を払って、例えば特定のDNA配列から切断点までの距離といった、病変の部位に関するいくらかの情報を得るために用いられたにすぎない。本発明は、核酸配列に基づいてパターン内のゲノムを染色するので、プローブの核酸配列を変えることにより必要に応じてパターンを変え得るということにおいて、化学的染色の適応性の欠如を克服する。本発明のプローブ-作出染色パターンは、細胞遺伝学分析において有用な信頼できる基礎的指標を提供する。

【0014】化学的染色バンドのイメージ分析による染色体の構造的異常の自動化検出は、慣用技術によって中期染色体上に作出されたバンディングパターンを検出しこれを解釈できるシステムの開発を必要とするであろう。化学的に染色された正常染色体を、自動化手段によって信頼性をもって同定することが非常に難しいことは分かったし、構造的異常、例えば転座を有する異常染色体を区別することはもっと難しい。慣用的にバンド化した染色体の転座の効果的な自動化検出は、10年以上にわたる精深な研究によっても完成しなかった。本発明のプローブ-作出バンディングパターンは、このような自動化検出、分析に対して適している。

【0015】近年において、染色体構造とその遺伝子内容およびDNA組成との関連に関する研究が急速に進歩した。一部には、この進歩は、遺伝子工学技術によって生産されたプローブに対する大量の純化DNAおよびRNA断片の利用に基づく遺伝子マッピングの改良された方法という形で行われた。例えば、Kao, 「Somatic Cell Genetics and Gene Mapping」, International Review of Cytology, Vol. 85, pp. 109-146(1983)、および D'Eustachio et al., 「Somatic Cell Genetics in Gene Families」, Science, Vol. 220, pp. 9, 19-924(1983)参照のこと。遺伝子マッピングのためのプローブは、一重鎖もしくは二重鎖DNAまたはRNAの標識された断片からなり、これらは染色体DNA上の相補的座位にハイブリダイズされる。このよ

うなプローブにおいては、関心のある座位以外の位置におけるハイブリダイゼーションを最小にするような純粋な、または均一なプローブを作ることが決定的に重要であった。Henderson, 「Cytological Hybridization to Mammalian Chromosomes」, International Review of Cytology, Vol. 76, pp. 1-46(1982)参照のこと。

【0016】ハイブリダイゼーションプロセスは、(プローブと標的が一重鎖核酸でなければ)、加熱または他の手段によってプローブと標的の二重鎖核酸を解くこと(unravelling)または融解(melting)を含む。このステップは核酸の変成と呼ばれることがある。プローブおよび標的の核酸の混合物が冷却すると、相補的ベースを有するストランドは再結合またはアニールする。プローブが標的の核酸と共にアニールすると、標的上のプローブの位置は、プローブが持つ標識により、またはプローブもしくはプローブ-標的のデュプレックス(duplex)のある内在的特徴によって検出できる。もし標的の核酸がその自然的生物学的セッティング(setting)内に、例えばDNAが染色体に、mRNAが細胞質、染色体または細胞核の部分に残留すれば(調製技術によって固定されまたは変換する)、このハイブリダイゼーションプロセスはインシットゥハイブリダイゼーションと呼ばれる。

【0017】インシットゥハイブリダイゼーションプローブは始めは、染色体もしくは細胞の遺伝子または他の明かになった核酸配列の同定に限られていた。シングルコピー(single-copy)プローブの正常および異常染色体へのマッピングの比較が、染色体異常の検査に用いられた。Cannizzaro et al., Cytogenetics and Cell Genetics, 39:173-178 (1985)参照のこと。反復プローブの多数の結合座位の分布も決定することができた。

【0018】一倍体ゲノム中に1つの標的座位を有するプローブ、シングルコピーまたは単一配列プローブによるハイブリダイゼーションは、ゲノム中の特定の遺伝子の位置をマップ化するために用いられてきた。[Harper and Saunders, 「Localization of the Human Insulin Gene to the Distal End of the Short Arm of Chromosome 11」, Proc. Natl. Aca. Sci., Vol. 78, pp. 4458-4460(1981); Kao et al., 「Assignment of the Structural Gene Coding for Albumin to Chromosome 4」, Human Genetics, Vol. 62, pp. 337-341 (1982)] しかし、このようなハイブリダイゼーションは標的座位が小さいときには信頼性がない。低度コンプレキシティ(complexity)シングルコピープローブに対する標的配列の量は小さいので、細胞集団中の潜在的標的座位の一部のみがプローブによってハイブリッドを形成する。したがって、プローブの特異的結合座位の位置のマッピングは、プローブの非特異的結合によって生じるバックグラウンドシグナルにより、また検出システム(例えばオートラジオグラフィまたは免疫化学)のノイズによって複雑化された。このような従来技術によるシングルコピープロ

ブに対するシグナルの信頼性の故に、プローブの特異的結合座位をマップ化するためには、多数の細胞中の見かけのハイブリダイゼーションシグナルの位置の統計的分析を必要とした。

【0019】異なった反復配列は染色体上に異なった分布を有するであろう。これらは、先に引用した文献に示されたように、全染色体上に広がっており、ゲノムのコンパクトな領域、例えば染色体の動原体上に濃縮しており、または他の分布を有するであろう。ある場合には、このような反復配列は主に単一染色体上に位置しており、このためこれは染色体-特異的反復配列である。[Willard et al., "Isolation and Characterization of a Major Tandem Repeat Family from the Human XChromosome", *Nucleic Acids Research*, Vol. 11, pp. 2017-2033 (1983)].

【0020】全染色体によって共有された反復配列に対するプローブは、もしその配列が種の1つに対して特異的であれば、異なった種の染色体の間を識別するために用いることができるであろう。このような反復配列に富む1つの種からの全ゲノムDNAは、このように用いることができる。[Pinkel et al. (III), *PNAS USA*, 83:2934 (1986); Manuelidis, *Hum. Genet.*, 71:288 (1985) and Durnam et al., *Somatic Cell Molec. Genet.*, 11:571 (1985)].

【0021】近來になって、選択された染色体に対して激しくかつ特異的にハイブリダイズする反復配列用のプローブ(反復プローブ)の利用の可能性が増した。[Trask et al., *Hum. Genet.*, 78:251 (1988)およびこのなかに引用された文献] 今やこのようなプローブはヒト染色体の半分以上に利用できる。一般的に、これらは動原体近傍の標的染色体のコンパクトな領域上の反復配列に結合する。しかしながら、ヒト染色体1p36にハイブリダイズする1つのプローブが報告されており、またヒト染色体Yqにハイブリダイズする幾つかのプローブがある。このようなプローブによるハイブリダイゼーションは、中期スプレッドにおける染色体の迅速同定、間期核中の選択された染色体のコピー数の決定 [Pinkel et al. (I), *PNAS USA*, 83:2934 (1986); Pinkel et al. (II), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:151 (1986) and Cremer et al., *Hum. Genet.*, 74:346 (1986)] および間期核中の染色体の相対的位置の決定を可能にする。[Trask et al., 前記; Pinkel et al. (I), 前記; Pinkel et al. (II), 前記; Manuelidis, *PNAS USA*, 81:3123 (1984); Rappold et al., *Hum. Genet.*, 67:317 (1984); Schardin et al., *Hum. Genet.*, 71:282 (1985); and Manuelidis, *Hum. Genet.*, 71:288 (1985)].

【0022】しかしながら、多くの適用は、適当なプローブの欠如によってなお制約されている。例えば、ここに記載する方法が発明されるまでは、出生前診断に対して十分な特異性を有するプローブが第13または第21染色

体に対して利用できなかった。さらに、反復性プローブは構造的異常の検出に対して非常に有用ではない。というのは、プローブがハイブリダイズした領域を異常を含む確率が低いからである。

【0023】以下に記載するのは、遺伝子再配列、例えばBCR-ABL融合に対して例示した再配列を検出する染色体-特異的試薬および方法であって、現有技術によっては入手できない情報を提供する。

【0024】

【課題を解決するための手段】本発明は、標的染色体物質に対して、前記標的染色体物質における各疑わしい遺伝子再配列を含む領域の座位に各々が相補的である標識された核酸断片の不均一混合物からなる核酸プローブを使用し、核酸配列に基づき染色体物質を染色する方法に関する。この方法は、特異的細胞遺伝学的分析に対して適合できる染色パターンを生じる。さらに、細胞遺伝学的分析に対して有用な核酸プローブを作ること本発明の目的であって、これは信頼性のあるシグナルによって染色体物質を染色する。このプローブはインシトゥハイブリダイゼーションに適している。本発明のある適用に対して好ましい核酸プローブは、2またはそれ以上の各標的座位を確実に染色するのに十分なコンプレキシティを有するものである。

【0025】本発明は、染色体物質を染色するための方法および組成物を提供する。ハイブリダイゼーション技術の現状における本発明のプローブ組成物は、典型的に高度のコンプレキシティを有し、通常は50kbより大きいコンプレキシティであって、このコンプレキシティはプローブが設計される適用に依存する。特に、染色体-特異的染色試薬としては、核酸断片の不均一混合物からなり、各断片は特異的染色が所望されている核酸-標的核酸、好ましくは標的染色体物質の一部分に実質的に相補的である配列の実質的断片を有するような試薬を提供する。一般的に、核酸断片は、ここに例示しかつ後に示すような手段によって標識される。しかしながら、核酸断片はプローブ断片の被検出標的との結合のために順序正しく直接に標識される必要はなく、例えばこのような核酸結合は抗-RNA/DNAデュプレックス抗体およびチミジンダイマーに対する抗体によって検出できる。不均一混合物の核酸断片には、二重鎖もしくは一重鎖RNAまたはDNAを含む。

【0026】本発明は、疑わしい遺伝子再配列の近傍にある標的染色体物質を染色する染色体-特異的試薬および方法に関する。このような遺伝子再配列には、転座、逆位、欠失、増幅および挿入が含まれるが、これらに限定されない。このような遺伝子再配列が疾患と関連しているときには、この染色体特異的試薬は、疾患特異的試薬またはプローブと呼ばれる。また、このような遺伝子再配列が癌と関連しているときには、この試薬は腫瘍特異的試薬またはプローブと呼ばれる。

【0027】本発明は、1または複数の疑わしい遺伝子再配列の近傍にある標的染色体物質を確実に染色する核酸プローブを提供する。遺伝子再配列の検出に対して有用なこのような核酸プローブは、典型的に高度のコンプレキシティを有する。このような核酸プローブは、好ましくは遺伝子再配列と関連する切断点間に部分的または全体にわたって、わきに位置し(flank)および/または延びる染色体領域における核酸配列と実質的に相同な核酸配列からなる。

【0028】さらに、本発明は、細胞遺伝学的には類似であるが遺伝学的には異なる染色体再配列の間を識別する方法および試薬を提供する。

【0029】ここに特に例示するのは、慢性骨髄性白血病(CML)の診断に役立つBCR-ABL融合を生じる遺伝子再配列、例えば転座、欠失、増幅および挿入を検出する染色体-特異的試薬および方法である。CML診断用のこの染色体-特異的試薬は、CMLと関連する染色体領域 9q34および22q11の転座切断点領域の近傍における染色体配列と実質的に相同な核酸配列を含む。

【0030】これらの試薬は、CMLの特徴であるBCR-ABL融合が起こると、独特に変わる染色パターンを生ずる。図11A~11Fに図式的に種々の染色パターンを示すが、これらは他の潜在的染色パターンと共に、遺伝子再配列、例えばBCR-ABL融合の存在において変えられる。これらの図には、構造的異常検出のための幾つかの典型的なプローブ戦略を示す。プローブの結合パターン、色などの設計は、中期および/または間期細胞における遺伝子異常の検出のために、最適にすることができる。異なったパターンが個々の適用に対して有利となるであろう。図は、幾つかの異常の検出に対して有用な幾つかのパターンを示す。これらの例は、代表的なものであって究極的なものではないので、異なったパターンを組み合わせることができ、同一細胞内の多数の異常の検出を可能にする。これらの各図面において、中期染色体は両染色分体に結合したプローブを伴って示されている。間期核が描かれているのは、プローブが結合する染色体の部分の複製前における細胞サイクルの段階であるので、各間期染色体に対してただ1つの染色分体があるにすぎない。プローブの結合が染色体のただ一部分のみに制限されると、シグナルは、黒または白の円として示される。このような表示は、異なった色または別の識別可能な染色特性を示すために用いられる。2つ以上の識別可能な特性(3色、色の異なった比など)を含むパターンは、ここに図示されたものよりより複雑な染色パターンを可能にする。DNA中の切断点の染色体上の位置は、異常染色体に隣接する水平線によって示される。

【0031】図11Aのセクションは、染色体全体を染色するプローブの使用を示す。このようなプローブは、その染色体に沿ってどこかで起きる転座を検出するために用いることができる。図12の写真は、転座を検出す

るために第22染色体に対するこの染色の使用を示すが、この患者においてはCMLに伴って起きているものである。染色のこのようなアプローチは、染色される核の領域が比較的に大きいので、間期核においては非常に有効であるとはいえず、染色された領域における重複は多くの核において解釈を難しくする。

【0032】図11Bのセクションは、図11Aで示された染色体の染色領域の切断点近傍の領域への縮小を示し、その領域における事象に焦点を合わせた情報を提供する。染色パターンは、切断点を横切って連続または不連続であり、このためある結合は切断点の両側にある。このような染色パターンは、ただ1つの"色"のみを必要とするが、他のどのようなゲノム領域が組み換え(exchange)に含まれるかについては何ら情報を与えない。

【0033】図11Cのセクションは、再配列の結果として共に生じた配列と結合して、中期、間期の細胞中の検出を可能にするプローブの使用を示す。この場合には、異なった配列は異なった「色」で染色される。このような染色パターンは、この出願のセクションVIIの例において使用されるものである。

【0034】図11Dのセクションは、再配列に含まれる両切断点の両側の染色を含むことによって、図11Cの延長を示す。示したように、異なった「色」が使用される。より複雑な染色パターンによって供給される追加の情報は、核の解釈の助けとなる。また、そこでの議論のように明白な挿入事象の認識も可能となる。

【0035】図11Eのセクションは、染色体の1つの相同体における挿入の検出を示す。

【0036】図11Fのセクションは、欠失の検出に有用な染色パターンを示す。欠失は、欠失領域のみを染色するプローブによっても検出できるが、プローブ結合の欠如は、標的配列の欠失以外の理由によるかもしれない。わきに位置する異なった「色」に染色された領域は、ハイブリダイゼーションに対する対照としての役目をする。

【0037】遺伝子再配列の存在は、ここに記載した方法に従って本発明の試薬を用い、かつ生じた染色パターンのシグナルの近接および/または他の特徴を観察することによって決定できる。

【0038】好ましくは、本発明のCML検出用染色体-特異的試薬は、約50キロベース(kb)から約1メガベース(Mb)まで、より好ましくは約50kbから約750kbまで、さらに好ましくは約200kbから約400kbまでのコンプレキシティを有する核酸配列からなる。

【0039】さらに、本発明は、1つのゲノム内において比較的に近接して生じる疑わしい遺伝子再配列の間の識別方法を提供するが、この染色体-特異的試薬は前記疑わしい遺伝子再配列の近傍における核酸配列と実質的に相同な核酸配列からなる。2つの潜在的遺伝子再配列の間のこのような鑑別の例としては、急性性リンパ性白血

病(ALL)からのCMLの識別診断である。

【0040】さらになお、本発明は、遺伝子再配列に関連した疾患、例えばCMLにおけるBCR-ABL融合に関連した疾患に苦しむ患者において染色パターンを作出する方法および試薬を提供し、この染色パターンは種々の治療的養生、例えば化学療法、照射、外科、移植、例えば骨髄移植に対する患者の反応を予知しおよび/または表示する。このような染色パターンは、このような患者の状態を、好ましくは個々の細胞を染色することによって監視するのに有用であり、また軽快化にある患者に対しては疾患の再発を予知することができる。コンピュータを利用した検鏡分析は、本発明の染色パターンの解釈を助けることができ、また本発明は、コンピュータ利用の検鏡分析が、個々の細胞を染色することによって患者の細胞を試験する、例えば患者に残留する疾患を探索するのに用いられる方法を提供する。

【0041】さらになお、本発明は、遺伝子の疾患の分子のベースを決定し、また特異的に遺伝子に基づく疾患を検出する方法および試薬を提供する。

【0042】さらになお、本発明は、核酸プローブのインシットゥハイブリダイゼーションからなる隣接する遺伝子症候群を検出する方法と試薬を提供するが、このプローブは、隣接する遺伝子症候群の1または複数の成分の特徴である核酸配列に実質的に相同である配列を含む。このような隣接する遺伝子症候群の代表はダウン症候群である。

【0043】また、1つのゲノム内の多数の座の遺伝子再配列を同時に検出する方法を提供するが、これは高度コンプレキシティ核酸プローブのインシットゥハイブリダイゼーションからなり、かつこのプローブは、ゲノム内の多数の座における核酸配列に実質的に相同である核酸配列を含む。

【0044】さらになお、1つのゲノム内の遺伝子再配列を探索する方法を提供する。例えば、慣用のバンド分析は、検査されているゲノムの染色体領域における異常を示すであろう。本発明の方法は、正常なゲノムのその染色体領域の近傍から作出した核酸プローブをインシットゥハイブリダイゼーションにより異常を含む細胞に適用することを含み、これによって、生じた染色パターンの観察により前記異常の遺伝子再配列の正確な位置と種類とを詳細に知ることができる。

【0045】さらになお、本発明は、遺伝子再配列の迅速、効率的、かつ自動化された検出に対して最適化された高度コンプレキシティ核酸プローブを提供する。

【0046】高度コンプレキシティプローブを作出する1つのやり方は、数個または多数のクローン、例えばとりわけファージ、プラスミド、コスミドおよび/またはYACクローンをプールすることであり、各クローンはゲノム内の標的のある部分にハイブリダイズすることができるインサート(insert)を含む。このようなプローブを

作出するもう1つのやり方は、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)を用いることである。

【0047】標識された核酸断片の混合物に関する不均一とは、染色試薬は各断片が異なった配列および/またはサイズを有する多くのコピー（例えばプローブを作るためにプールした異なったDNAクローン）からなるということの意味する。使用のための準備としては、これらの断片をランダムに、または特異的に切断して、ハイブリダイゼーションに関する核酸のピースのサイズ分布を調整する。

【0048】以下により十分に論議するように、好ましくは不均一プローブ混合物は非標的核酸に対してハイブリダイゼーション能力を持った核酸配列から実質的にフリーである。このような配列の多くは、標的および非標的核酸によって共有された反復配列、すなわち共有反復配列に結合している。

【0049】所望しない核酸配列を除去しおよび/またはこのような配列のハイブリダイゼーション能力を役立たなくするための方法については、後により十分に論議する。[セクションII参照]このような方法は、共有反復配列のプローブからの選択的除去またはスクリーニング、プローブ中のインクルージョン(inclusion)に対する核酸配列の注意深い選択、標識されないゲノムDNAの添加による共有反復配列のブロッキング、またはブロッキング混合物中のインクルージョンに対する核酸配列のより注意深い選択、および高コピー反復配列の再結合のために十分な時間をかけたプローブ混合物のインキュベーションなどを含むがこれに限定されない。

【0050】好ましくは、本発明の染色試薬は、インシットゥハイブリダイゼーションによって間期または中期の染色体DNAに施され、かつ染色体は、染色試薬を含む核酸断片上における標識、例えばビオチンまたは³²Pの存在を検出することによって同定、または分類、すなわちカリオタイプされる。

【0051】本発明は、染色体の全ゲノム補体に対する染色体染色試薬、単一染色体に特異的な染色試薬、染色体のサブセットに特異的な染色試薬、および単一または多数の染色体中のサブリージョンに特異的な染色試薬を含む。述語“染色体-特異的”は、本発明の染色試薬のこれら実施態様の全てを包含するものと解釈される。また、この述語は、正常染色体、異常染色体型の両方から作られ、またこの両方に向けられた染色試薬を包含するものと解釈される。

【0052】本発明の染色体-特異的染色試薬を作る好ましい方法に含まれるのは、1)ゲノム内の特定の染色体型または1もしくは複数の標的領域からの染色体DNAの分離、2)核酸断片の不均一混合物を形成するための分離DNAの増幅、3)核酸断片中の共有反復配列のハイブリダイゼーション能力を役立たなくすること、または除去、および4)標識された核酸断片の不均一混合物を

形成するために核酸断片に標識することである。より十分に後に記載するように、特定の実施態様に対するステップの順序は、ステップを実施するために採用される特定の手段に従って変わる。

【0053】本発明は、染色体のカリオタイプに関連する問題、特に診断的および線量測定の適用に向けられている。特に、本発明は、次のような染色の欠如に起因する問題を克服する。すなわち、それは、標的DNAおよび／またはRNA、例えば標的染色体、染色体の標的サブセット、または特定染色体の標的領域にハイブリダイズできる核酸断片の不均一混合物を含む試薬を提供することによって十分に染色体-特異的な染色である。本発明の染色技術は、標準的臨床および実験室装置と自動化技術を利用する改善された分析を用いることによって、中期、間期の両方の細胞における染色体異常、特に遺伝子再配列の迅速、高感度検出の可能性を切り開くものである。これは遺伝子スクリーニング、癌診断、および生物学的線量測定に直接に適用できる。

【0054】さらに、本発明は特に、中期のように濃縮していても、また間期のように分散していても、胎児染色体物質を染色する方法および核酸プローブを提供する。さらになお、本発明は、胎児細胞の染色体物質のカリオタイピングの胎児非侵襲的方法を提供し、胎児細胞は母性の血液から分離されたものである。好ましくは、このような胎児細胞は、白血球および／または細胞栄養層である。典型的な核酸プローブは、染色体型13、18および／または21に対して染色体-特異的な高度コンプレキシティブローブである。代表的なプローブは、染色体-特異的なブルースクライブ(Bluescribe)プラスミドライブラリーを含み、これは標的胎児染色体とのハイブリダイゼーションの前および／または期間中に十分な数の共有反復配列が除去され、またはそのハイブリダイゼーション能力が役立たなくされたものである。

【0055】さらになお、本発明は、腫瘍細胞遺伝学、疾患関連の座の検出、構造的異常、他の遺伝子再配列のなかでも例えば転座の分析に使用し、また生物学的線量測定に対して適当な核酸プローブを含むテストキットを提供する。

【0056】さらに、本発明は、本発明の適当な核酸プローブを含む出生前のスクリーニングキットを提供する。また、本発明は遺伝子再配列、特にCMLの特徴であるBCR-ABL融合を生じる再配列検出用の高度コンプレキシティブローブを含むテストキットを提供する。

【0057】本発明の方法および組成物は、所望の適用に対して適当したパターンを伴った染色体物質の染色を可能にする。パターンは、1または複数の染色体の幾つかの領域、または1つのゲノムの幾つかもしくは全染色体にわたって延び、かつ例えば多数の色によって識別可能な多数の部分を含むことができる。また、その代わりに、パターンは、1つのゲノムの特定の1または複数の

部分、例えば1または複数の腫瘍に対して診断的にもしくは予後的に重要な欠失または切断点を潜在的に含む1または複数の部分、または出生前の診断に重要な染色体のそれらの部分に焦点を絞ることができる。

【0058】染色パターンは、用いられる分析方法、例えば人による観察または自動化装置、例えばフローサイトメータまたはコンピュータ利用の検鏡に対して調整できる。パターンは、濃縮染色体または分散染色体物質の分析に対して適当するように選択することができる。

【0059】さらに、本発明は、本発明に従って作られた染色パターンによって示される、染色体異常、特に遺伝子再配列を検出、分析する自動化手段を提供する。

【0060】本発明の他の目的は、非自己相補的一重鎖DNAハイブリダイゼーションプローブを調整し適用するために現在利用できる技術に代わる方法を提供することである。

【0061】本発明の他の目的は、プローブの非特定のかつ誤った結合を減少することによって、インシトゥハイブリダイゼーションにおいて到達可能なシグナル対ノイズ比を改善することである。

【0062】本発明の他の目的は、プローブの配列に対して非相補的であり、ハイブリダイゼーションに対して利用できる一重鎖領域を最小にする二重鎖標的DNAを、ハイブリダイゼーションプローブの適用に対して変性する手段を提供することである。

【0063】プローブは、DNAを制限エンドヌクレアーゼにより処理することによって染色体DNAから構成することができるが、これは用いるエンドヌクレアーゼの特徴をなす「付着」端("sticky" end)または付着切断端(s tagged cut)を有する制限断片のコレクションを生じる。すなわち、カットによって導入された2つの断片末端は、それぞれ突出したストランドと引っ込んだストランドとからなる。制限断片は、この型の制限断片を受け入れるように加工されたベクターに挿入され、そしてベクターは、制限断片の数を増すべく成長した宿主生体内にトランスフェクトされる。次に、ベクターは宿主生体から分離され、制限断片は切り出されベクターから分離される。制限断片の各末端において、引っ込んだストランドは適当なエキソヌクレアーゼによってダイジェストされる。ダイジェスチョンは完結を許されない。エキソヌクレアーゼ処理された制限断片は次いでDNAポリメラーゼに対する鋳型/プライマーとして使用され、これは標識された前駆体の存在においてダイジェストされたストランドに代わる。このプロセスに適した酵素の例は、DNAポリメラーゼ Iの大きな断片によって処理されたエキソヌクレアーゼ III、またはT4 DNAポリメラーゼであって、これは反応条件の変化によって両方の機能を果たすことができる。合成が完了した後、制限断片は、最初の制限断片の標識した部分が実質的に元のままに残るように、より細かな断片に分割される。この細かな断片

は変性され、標識されたストランドは標識されないストランドから分離されて、ハイブリダイゼーションプローブを形成する。一重鎖プローブを用いるこの方法においては、標的DNAにハイブリダイゼーションプローブを施す前に、先ず標的DNAを、クローニングベクターからプローブDNAを切り出すために用いたのと同じ制限エンドヌクレアーゼで処理する。この処理は、標的DNAを、各末端に制限エンドヌクレアーゼの特徴である尾部を有する制限断片のコレクションに分割する。次に、標的DNAは、引っ込んだストランドを除去するエキソヌクレアーゼで処理されるが、これによって制限エンドヌクレアーゼによって導入されたカットの近傍に一重鎖DNAを露出させる。最後に、より十分に後に記載するように、例えば標準インシットゥハイブリダイゼーションプロトコル(p rotocol)を用いて、ハイブリダイゼーションプローブを標的DNAに適用する。

【0064】一重鎖プローブ法の重要な特徴は、クローンされたプローブDNAと標的DNAとを同一の制限エンドヌクレアーゼで処理することである。これは、標的の一重鎖DNAがプローブの標識されたストランドと相補的であることを確実にする。もちろん、多くの制限カットがあるので、正しい結合座位に加えて標的の多くのセグメントが一重鎖化されるであろうが、全一重鎖標的は無差別変性によって作られるよりもずっと少ないであろう。加えて、このやり方で一重鎖化された標的DNAは自身によって再アニールができず、このためプローブへのアクセスを妨げることができない。

【0065】このような方法の他の重要な(しかし決定的ではない)特徴は、標識したストランドを標識されないストランドから分離することを可能にする標識の選択である。好ましくは、前駆体はビオチン化(biotinylation)によって標識され、また標識されたストランドはアフィニティークロマトグラフィーによって標識されないストランドから分離される。

【0066】

【発明の作用および効果】本発明は、プローブの使用上従来技術の有する制約を克服し、細胞遺伝学的分析に対するインシットゥハイブリダイゼーションの適用を劇的に増すものである。前記のとおり、従来技術によるプローブは、徹底的な細胞遺伝学的分析に対して有用ではなかった。低度コンプレキシティシングルコピープローブは、ハイブリダイゼーション技術のこの段階においては信頼性のあるシグナルを発生しない。反復性プローブは信頼できるシグナルを生ずるが、このようなシグナルは、ゲノムにおける反復配列の固定した分布のために、異なった適用に対して適合させることができない。本発明のプローブは、反復性プローブのハイブリダイゼーション信頼性を、プローブの結合パターンを所望の適用に対して適合させることができる融通性と結合させる。

【0067】本発明によるプローブの高められた能力

は、その増加したコンプレキシティに由来する。プローブのコンプレキシティの増加は、標的領域へのハイブリダイゼーションの確率、ひいては強度を増すが、またバックグラウンドシグナルをもたらず非特異的ハイブリダイゼーションの確率も増加させる。しかしながら、本発明の概念においては、このようなバックグラウンドシグナルはゲノム上にはほぼランダムに分布しているものと考えた。したがって、最終的結果としては、標的領域は、このようなバックグラウンドシグナルに対するコントラストの増加によって可視化できるということである。

【0068】ここには、概略のコンプレキシティ範囲で約50,000ベース(50 kb)から数億ベースからなるプローブが例示されている。このような代表的プローブは、コンパクトな座とヒト染色体全体に対するものである。本発明の前には、インシットゥハイブリダイゼーションに使用されるプローブは、40 kb以下、さらに代表的には数kbのオーダーのコンプレキシティを有していた。

【0069】本発明のプローブを用いた染色体物質の染色は、従来技術による化学的染色とは顕著に異なっている。本発明のプローブ作出染色の特異性は、全く新規な源-ゲノム中の核酸配列から生じる。かくして、本発明の染色パターンは、特定の適用に対して重要な基礎的遺伝子情報を目だたせるように設計することができる。

【0070】本発明により所望の特異性をもつプローブを作るための手法は、細胞遺伝学研究の広い範囲に顕著な進歩をもたらす。分析は中期染色体と間期核について行うことができる。本発明の技術は、慣用的方法による高品質のバンディングが難しいか、偏った情報が得られるという懸念がある適用、例えば腫瘍細胞遺伝学に対して特に有益である。診断上または予後上重要であることが知られている病変、他の腫瘍特異的遺伝子配列のなかでも例えば腫瘍型-特異的転座および欠失の座位を標的とした試薬は、このような異常の迅速な認識を可能にする。分析の速度が主な関心事である場合、例えば有毒環境薬剤によって誘発される低頻度の染色体異常の検出には、本発明の組成物は、慣用の染色体バンディングに基づく従来技術と比較して、検査効率において劇的な向上を可能にする。

【0071】さらに、疾患-関連の染色体異常(例えばトリソミー21)に対する出生前スクリーニングは、本発明による方法と組成物による異常の迅速検出によって強められる。本発明による間期異数体分析は、出生前診断に対して特に顕著であり、細胞培養法によるよりもより迅速に結果が得られる。さらに、母性の血液から分離される胎児の細胞は、日常の手法によっては培養することができず、このため慣用のカリオタイピング技術によって分析することもできないが、本発明の方法と組成物によれば検査することができる。これに加えて、染色パターンの強度、コントラスト、色の組合せは、特定の適用に対してパターンを適合させる能力と連携して、自動化

された細胞遺伝学的分析、例えばフローサイトメトリーまたはコンピュータ化した検鏡検査およびイメージ分析に対する機会を増した。

【0072】本出願は、特に遺伝子再配列の検出のための染色体-特異的試薬と、このような再配列を検出するためにこの試薬を使用する方法について特許を請求する。このようにして検出される代表的な遺伝子再配列は、慢性骨髄性白血病(CML)の診断に役立つ融合遺伝子-BCR-ABL-を生じる再配列である。

【0073】慢性骨髄性白血病(CML)は、骨髄細胞の悪性増殖であって、一般的に第9および第22染色体上におけるBCRおよびABLの融合によって特徴づけられる。この融合は通常は相互転座 t(9;22)(q34;q11)を含み、細胞遺伝学的に独特のフィラデルフィア染色体 (Ph⁺)を生ずる。しかしながら、もっと複雑な再配列がBCR-ABL融合の原因となることがある。分子レベルにおいては、融合はサザン分析またはポリメラーゼ鎖反応(PCR)を用いる融合遺伝子からmRNAのインビトロ増幅によって検出できる。これらの技術は鋭敏ではあるが、単一細胞には適用できない。

【0074】明らかに、染色体異常、より特定には遺伝子再配列、例えばCMLに関連した腫瘍特異的配列検出の鋭敏な方法は、遺伝学的スクリーニングに対して非常に有用な道具であろう。本発明はこのような道具を提供する。

【0075】

【発明の実施の形態】本発明は、標的染色体物質を1または複数の全染色体に延びるパターンに染色し、および/または1または複数の染色体における1または複数の領域に延びるパターンに染色する核酸プローブの使用に関するもので、当該パターンは全ゲノムにわたって延びるパターンを包含する。本発明の染色試薬は正常な染色体と異常な染色体の顕微鏡的同定、および/またはフローサイトメトリック同定を容易にし、かつ遺伝子配列のごとき特有の異常な遺伝子の性質の特性を提供する。本明細書において、「染色体-特異的」なる文言は「標的-特異的」および「領域特異的」なる文言を包含するものと定義される。すなわち、染色組成物が1個の染色体に導かれる場合、それは染色体-特異的であるが、染色体組成物が例えば、多数の染色体にける多数の領域に導かれる場合、単に1個の染色体の1領域に導かれる場合、または全ゲノムにわたる領域に導かれる場合にも、これらは染色体-特異的である。染色体-特異的な文言は組換えDNAライブラリーを使用することによる。当該DNAライブラリーは本発明の最初のプローブのための源物質のごとき、単一の正常染色体から得られるDNAをクローニングすることにより作られる。1または複数の染色体の領域からのDNAから作られたライブラリーは、ゲノムのこれらの領域のプローブのためのDNAの源である。かかる源物質から形成されたプローブは領域-

特異的プローブであり、これもまた「染色体-特異的」なる幅広い文言に包含される。「標的-特異的」なる文言は本明細書においては「染色体-特異的」なる文言と互換的に使用される。

【0076】当該技術において一般に使用される「特異的」なる文言は、2つのやや異なる意味を持っている。本明細書においては下記の慣習に従う。「特異的」とは核酸配列の起源または同核酸配列が、染色試薬の一部としてゲノムにハイブリダイズする様式に関係する。例えば、特定された染色体からのDNAの分離およびクローニングは「染色体-特異的ライブラリー」をもたらす。[E.g., Van Dilla et al., "Human Chromosome-Specific DNA Libraries: Construction and Availability", Biotechnology, 4:537(1986).]。しかしながら、かかるライブラリーは他の染色体と共有する配列を含んでいる。これらの共有配列は同共有配列のハイブリダイゼーション特性を誘導される染色体に対しては染色体-特異的ではなく、同共有配列は起源の染色体よりも多く結合する。配列は、ゲノムの所望の部位にのみ結合する場合に「染色体-特異的」である。かかる配列は標的または反復配列 (repetitive sequences) に包含されるシングルコピー配列を含み、これらの配列においてコピーは標的物質に抜群に包含されている。

【0077】「染色試薬」を変更することにおける「染色体-特異的」とは、試薬を含む核酸配列の全体のハイブリダイゼーションの様式に関係する。染色試薬は、標的染色体物質と非標的染色体物質間に有効な顕著なコントラストが達成されるならば、染色体-特異的である（すなわち、標的物質が十分に可視化できる）。

【0078】本明細書においてプローブは、標的物質に対するハイブリダイゼーションが検出できる核酸断片の集合体であると定義される。プローブは後述のごとく標識され、その結果標的物質への結合が可視化出来る。プローブは核酸配列のある源、例えばクローンの集合体またはポリメラーゼ鎖反応 (PCR) の集合体から形成される。源核酸はその後ある手段例えば反復配列の除去、または同反復配列を相補的配列とともに標識されない核酸によりブロッキングすることにより処理され、その結果得られるプローブによるハイブリダイゼーションは標的物質に十分な差異ある染色物を作り出す。従って、本明細書において、プローブなる単語は検出可能な核酸のみならず、例えばブロッキング核酸等とともに標的物に適用される形態において検出可能な核酸に関しても使用される。ブロッキング核酸については別に言及する。「プローブ」が特別に関係することからは、文言が使用される状況から明確である。

【0079】本発明に係る2またはそれ以上の核酸プローブが混合される場合、これらの核酸プローブは新しい1つのプローブを形成し、同プローブは本発明の方法に従って標的物質にハイブリダイズされると、成分プローブ

ブにより個々に形成される染色パターンの組合わせである染色体パターンを形成する。従って、「プローブ」および「プローブズ」(すなわち単数形および複数形)なる文言は、形成される染色パターンの状況において互換的に使用される。例えば、本発明に係るあるプローブが第9染色体にドットを形成し、かつ本発明に係る他のプローブが第11染色体にバンドを形成する場合、これら2つのプローブズはドット/バンド染色パターンを形成する1つのプローブを構成する。

【0080】本明細書において「標識される」なる文言は、プローブが変更された構成物質を直接導くか否かにかかわらず、結合プローブ(bound probe)を可視化する方法があることを示すために使用される。後述のセクションIIIはプローブを直接標識する種種の手段および結合プローブが検出可能な他の標識手段を述べている。

【0081】本明細書において「染色」(staining)または「着色」(painting)なる文言は、本発明に係るプローブをゲノムまたはそのセグメントにハイブリダイズすることを意味するものと定義され、従ってプローブは標的染色体物質に確実に結合し、結合プローブは可視化可能になる。「染色」または「着色」なる文言は互換的に使用される。「染色」または「着色」によりもたらされるパターンは細胞遺伝学的分析、特に分子細胞遺伝学的分析にとって有用である。染色パターンは正常および異常染色体の顕微鏡的同一および/またはフローサイトメトリック同一、および特殊な異常状態の遺伝学的性質の特徴付けを容易にする。後述のセクションIIIは可視的なプローブを分離する方法を示している。プローブを可視化するのに多数の適合する方法が利用でき、プローブの異なる構成物質の結合パターンが例えば色によって識別し得る。従って、本発明は1または複数の色(多色染色パターン)および/または他の指標手段で、可視化された染色体上で所望の染色パターンを形成することができる。本明細書で定義された「染色」なる文言は、慣用的なカロタイピング法(karyotyping methods)のごとき化学試薬で染色体を染色する概念を包含しない。但し、かかる慣用の染料は、プローブが結合しないゲノムの部分の可視化を可能にするために、本発明に係るプローブとともに使用されてもよい。かかる目的のためDAPIおよびプロビジウム アイオダイドの使用が図面に示されている。

【0082】本明細書において「高度コンプレキシティ」(high complexity)なる文言は、プローブが同プローブにおける非反復核酸配列をベースとして、50,000(50kb)またはそれ以上、数1000万または数10億までのオーグで含むことを意味するものと定義される。例えば、本発明に係る典型的な高度コンプレキシティ核酸プローブは50kb以上、100,000(100kb)以上、200,000(200kb)以上、500,000(500kb)以上、100万(1Mb)以上、2Mb以上、100Mb以上、500Mb以上、10億以上、さらには数10億以上

のコンプレキシティを持つことができる。

【0083】本明細書において「コンプレキシティ」なる文言は、ブリテン等により確立された核酸コンプレキシティのための標準に従って定義される。[Brittens et al., Methods of Engymol., 29:363(1974)]。核酸コンプレキシティのさらに詳しい説明および具体例については、カンターおよびシンメルの下記の文献を参照せよ。

[Canter and Schimmel, Biophysical Chemistry: Part II, The Behavior of Biological Macromolecules, at 1228-1230 (Freeman and Co. 1980)]。

【0084】本発明に係るプローブ組成物にとっての好ましいコンプレキシティは、設計される適用に依存する。通常、標的領域が大きいほど、プローブはより大きなコンプレックスである。染色体上の目標の好ましいパターンを形成するために必要とするプローブのコンプレキシティは、同パターンの形成の進行がハイブリダイゼーション技術にて行われるために、ハイブリダイゼーション感受性が増大する程減少することが予想される。感受度が増大すると、より小さな標的座位からのシグナルの確実性は増大するであろう。それ故、現在約40kbから約100kbの標的配列が確実で、容易に検出可能なシグナルを形成するのに必要であるのに対して、将来にはより小さな標的配列が確実なシグナルを提供するであろう。それ故、ハイブリダイゼーション感受性が増加するほど、あるコンプレキシティ例えば100kbのプローブは、現在確実に検出されるよりも多くのゲノムの遺伝子座を相当に検出することをユーザに可能とする。従って、より多くの情報が同じコンプレキシティのプローブから得られるであろう。「コンプレキシティ」なる文言はそれ故、如何に多くの可視的に個別の遺伝子座が検出されようとも、すなわちゲノムを越えた標的座位の分散にかかわらず、全プローブのコンプレキシティに関係する。

【0085】上記したように、現在のハイブリダイゼーション技術では、ゲノムにおけるコンパクトポイントを標的とした約40kbから100kbのプローブ(例えば1または小数のコスミッドのプローブインサート能力)で確実に、容易に検出できるシグナルを得ることが可能である。例えば、約100kbの範囲のコンプレキシティは腫瘍の特異的転座の両側にハイブリダイゼーションを許容する。切断点の一方側を標的としたプローブの部分は切断点の他側を標的とした部分とは異なって標識され、これにより両側は例えば異なる色で識別できる。プローブのコンプレキシティを比例的に増大することは、同時にゲノムの多数の緻密な領域の分析を可能とする。化学的染料によって形成された通常のバンディングパターンは本発明により、プローブを基礎とし、カラーコードされた各染色体またはそれらの重要領域に沿った関連点のシリーズに置き換えられる。

【0086】ゲノムの延在した隣接領域、例えば全染色体を均一に染色するには、標的領域のコンプレキシティ

に比例するプローブ コンプレキシティが必要である。但し、実質はそれより少ない。要求されたコンプレキシティは、標的物質上で確実に実質的に均一なシグナルを提供するためにのみ必要である。後述するセクションV. B. は、約50メガベース(Mb)のDNAを含むヒト第21染色体の蛍光染色が約1Mbのプローブ コンプレキシティで十分であることを証明している。図4 Hは、約200MbのDNAを含むヒト第4染色体に対する約400Kbのプローブのハイブリダイゼーションを示している。この場合、プローブの個々の要素のハイブリダイゼーション間のギャップ(gaps)が可視化される。図4 Bおよび図4 Fは、それぞれ第4染色体および第21染色体のために全ライブラリーにより作り出されたプローブで達成された結果を証明している。染色体は図4 Bおよび図4 Fに示すように、図4 Hのパターンを形成するために使用されたシングルコピー核酸配列からなる、より低度のコンプレキシティアプローブによる場合に比較してより濃密に染色される。

【0087】コンプレキシティを十分な染色を行うのに要求される最小値を越えて増加することは、プローブの全核酸濃度がハイブリダイゼーションの損なわれる点を下回る程度残る限りにおいては有害ではない。プローブにおける配列の一部分の濃度の減少は、標的座位の数の増加により補われる。実際に、二重鎖プローブを使用する場合、配列の各部分を比較的低濃度に維持することは好ましく、これにより同配列の各部位が標的物質における結合座位を見つけることができるまで再結合を阻止する。

【0088】本発明の染色パターンは1または複数のバンドからなる。本明細書において「バンド」なる文言は、プローブ成分に結合した標的核酸配列からなるゲノムにおける関連点(reference point)として定義される。同プローブ成分のデュプレックス(duplex)はある指示手段により検出することができ、かつ最も狭いディメンジョン(dimension)において、ハイブリダイゼーションおよび機器使用等の条件および慣習(protocol)のもとで確実なシグナルを提供する。バンドは確実なシグナルを提供する配列の狭いディメンジョンから、多数の染色体における多数の領域まで全染色体にまで延在することができる。

【0089】本発明のプローブ形成バンドは、上記した本発明の背景で示したとき化学的染色により形成されたバンドとは識別されることである。本発明のプローブ形成バンドは核酸配列に基づくものであり、これに対して化学的染色により形成されたバンドは染色体の本来の特性によるもので、実質の核酸配列によるものではない。さらに、化学的染色により形成されたバンディングパターンは中期染色体に関して解明できるにすぎず、これに対して本発明のプローブ形成バンドは中期および間期染色体の両者の解明に有効である。

【0090】本発明に係るプローブを形成する方法

は、多くの異なる低度コンプレキシティプローブをプールすることである。かかるプローブは、その後それぞれクローン化された配列の「不均一混合物」を構成する。要求されるクローンの数は、標的領域の広がりおよびクローニングベクターの能力に依存する。標的物質が幾多の個別のコンパクトな遺伝子座、すなわち顕微鏡的解像の限界であるシングルスポット(single spots)で構成されている場合には、各スポットにとっては約40kb好ましくは100kbが通常の技術で与えられる確実なシグナルを与える。各スポットのためのプローブの部分は、例えば酵母人工染色体(YACS)からのシングル インサート、35-40 kbを含む幾多のコスミッドまたはプローブ配列、4kbの配列を伴う約25プラスミドから構成される。

【0091】図1 A、図1 B、図1 Cおよび図2 A、図2 Bは、インサートがラムダファージカロン21Aにクローンされた、第21染色体-特異的ライブラリーのヒト中期スプレッドへのハイブリダイゼーションを示す。ライブラリーにおける高度コピー反復配列のハイブリダイゼーション能力は、標識されないゲノムDNAのハイブリダイゼーション混合物への添加によって減少させた。プローブはビオチンによって標識され、これは緑色FITC-アビジン(fluorescein isothiocyanate avidin)によって検出された。染色体中の全DNAは、青色蛍光染料DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)によって染色した。

【0092】本明細書で例示されたクローンの典型的な不均一混合物はファージ(図1、図2および図3)、およびプラスミド(図4)を含む。酵母人工染色体(YACS)(図5)、および種間雑種細胞(図6)における単一ヒト染色体は、シングル クローンとして増殖できる単一遺伝子座および全染色体のための高度コンプレキシティ プローブの例である。

【0093】ゲノムのある点における塩基配列は、「シングルコピー」または「反復」のいずれかに分類できる。実際の目的のためには、配列は十分長いものであることを必要とし、これにより相補的プローブ配列は、使用されるハイブリダイゼーション条件のもとにおいて標的配列とともに安定なハイブリッドを形成できる。かかる長さは典型的には、ヌクレオチドの数10~数100の範囲にある。

【0094】「シングルコピー配列」は、その中にいて標的核酸配列の唯一のワンコピーが一倍体ゲノムとして存在することである。「シングルコピー配列」は当該技術において「非反復配列」としても知られている。「反復配列」は、ゲノムにおける同じ標的核酸配列のワンコピーより大きいものが存在するということである。反復配列の各コピーは、他のものと同一である必要はない。重要な特質は、配列が反復配列のファミリーの他の構成メンバーに十分に類似していることであり、これにより使用されるハイブリダイゼーションの条件のもとにおいて、プローブ核酸の同じ断片が各コピー

とともに安定なハイブリッドを形成できる。「共有反復配列」(shared repetitive sequence)はゲノムの標的領域、およびその他の領域においていくつかのコピーを伴う配列である。

【0095】形容詞である「シングルコピー」、「反復」、「共有反復」その他のこのような修飾語がプローブにおける配列を記述するために使用される場合には、これらの文言はプローブ配列が結合する標的物質における配列のタイプに関係する。従って、「反復プローブ」は標的物質における反復配列に結合する例であり、かつ「シングルコピープローブ」はシングルコピー標的配列に結合する例である。

【0096】反復配列は一倍体ゲノムにおけるマルチコピーの状態で生じる。コピーの数は2～数10万まで配列でき、その中で反復DNAのAluファミリー (Alu family) は後者の非常に多い変種の典型的なものである。反復のコピーはクラスターされ (clustered)、またはゲノムからインタースパースされる (interspersed)。反復物はゲノム、例えば各染色体の動原体の近くに生じる反復配列、および多数のタンデム反復 (VNTRs) における1または複数の場所でクラスターされる。[Nakamura et al., Science, 235:1616 (1987)] ; 反復物はシングル染色体から分散されてもよい。[例えば、反復物はBardoni 等, Cytogenet. Cell Genet., 46:575 (1987)により記述されたこと<X染色体上でのみ発見された]。反復物は全染色体、例えば反復配列のAluファミリーから分散されてもよい。

【0097】本明細書において、反復配列 (repetitive sequences)、反復配列 (repeated sequences) および反復物 (repeats) なる文言は互換的に使用される。

【0098】共有反復配列 (Shared repetitive sequences) はクラスターまたはインタースパースされる。クラスターされた反復配列 (Clustered repetitive sequences) はタンデム反復物 (tandem repeats) を含む。タンデム配列は、それらが染色体のバックボーンを形成するDNA分子上に近接する故にそう呼ばれる。クラスターされた反復物は1または複数の染色体の明確に定義された領域、例えば動原体領域に関連付けられる。1または複数のクラスターされた反復物は、染色体の相当大きなフラクションを形成するとともに、ゲノムの1または複数の非標的領域を共有し、かつその結果本発明で偉容された断片の不均一混合物から除去されるか、またはそれらのハイブリダイゼーションの能力が無能力化されるとしても、標的領域の染色の完全な均一性は可能ではない。この状況は、標識された核酸断片の不均一混合物を標的物質に結合することに関連して「実質的均一」なる文言の使用によって理解される。

【0099】本発明に係る染色体-特異的染色は、標的物質に対して配列特異的にハイブリダイズする核酸断片を使用することにより達成される。これらの配列はシン

グルコピーまたは反復のいずれかであり、その中で反復のコピーが標的領域において支配的に生じる。図4Hおよび後述のセクションVで詳述した実験結果は、プローブがシングルコピー配列でつくることができることを示している。しかしながら、図4Bのプローブのごときプローブにおいては、低度コピー染色体-特異的反復 [Nakamura et al., and Bardoni et al., *supra*] が同様にハイブリダイゼーションに寄与する。

【0100】ゲノムの非標的領域に相補的な核酸断片、例えば共有反復配列または非特異的配列がプローブ中に含まれる場合には、それらのハイブリダイゼーションが十分に無能力化されるかそれらの行き渡りが十分におさえられることを必要とし、これにより十分な染色コントラストが得られる。セクションVおよび図4Hには、クロソンのプールを含むプローブによるハイブリダイゼーションの例が示されており、同例においては各クロソンは個々に選択され、その結果シングルコピー配列または極低度コピー反復配列にハイブリダイズする。残りの図面には高度コピー反復配列にハイブリダイズした断片を含むプローブの使用例が示されているが、かかる高度コピー反復配列は無能力化されたそのような配列のハイブリダイゼーション能力を持っている。

【0101】本発明に係る核酸プローブはゲノムの標的部分にとって十分に特異的である必要はない。同プローブは「染色コントラスト」を形成しようと意図する。「コントラスト」はゲノムの標的部分の染色強度、他の部分の染色強度に対する比によって決定される。例えば、後記の[表1]に示すごとき特定の染色体をクロソニングすることにより形成されるDNAライブラリーは、全染色体を染色し得るプローブとして使用できる。ライブラリーはその染色体上でのみ発見される配列と、他の染色体と共有する配列を含む。ヒトゲノムの単純化されたモデル (生命にとってほぼ真実) においては、約半分の染色体DNAは各クラスに分かれる。全ライブラリーによるハイブリダイゼーションが結合座位の全てを飽和することができるならば、標的染色体は他の染色体の明度の2倍である (コントラスト比2)。何故ならば、標的染色体はプローブにおける特異的配列および共有配列からのシグナルを含み、これに対して他の染色体は共有配列からのシグナルを有するにすぎないためである。従って、プローブにおける共有配列のハイブリダイゼーションを適度に減少させることのみが、実質的にコントラストを高める。非標的配列にのみハイブリダイズする汚染した配列例えばライブラリー中の不純物は、同配列が染色コントラストを有効レベル以下には低下させない限度において、プローブ中に許容できる。

【0102】実際には、標的座位の全てがハイブリダイゼーションにより飽和されることはなく、多くの他のメカニズムが染色コントラストを形成することに関与する。しかしながら、このモデルはゲノムの大きな部分を

標的としたプローブの使用におけるある一般的な考察を示している。

【0103】要求されるコントラストは、プローブが設計される適用に依存する。染色体および核等を顕微鏡的に可視化する場合、全染色体を同定するためにはコントラスト比が2またはそれ以上でたりる。図4D～図4Fにおいては、コントラスト比は3-5である。標的領域の個々のセグメントが小さいほど、非標的領域の染色における変動に係する標的の確実な認識を可能にするために、大きなコントラストが必要となる。フロー サイトメリーまたは定量顕微鏡法を使用する蛍光強度測定により、細胞核中に存在する標的領域の量を定める場合、要求されるコントラスト比はゲノムにとって平均1/Tまたはそれ以上のオーダーである。ここで、Tは標的領域に含まれるゲノムのフラクションである。コントラスト比が1/Tに等しい場合、全蛍光強度の半分は標的領域からもたされ、他の半分はゲノムの残りからもたらされる。例えば、約10%のゲノムからなる第1染色体のために高度コンプレキシティブローブを使用する場合、要求されるコントラスト比は10のオーダーであり、それは第1染色体にとってゲノムの残りのコントラスト強度に等しい。

【0104】プローブによりゲノムの非標的領域に染色する背景は様々ではない。図4Fは、第21染色体特異的プローブが、他の末端動原体型ヒト染色体の動原体に隣接するコンパクト領域に強くハイブリダイズする、プローブ断片を含んでいることを示している。この程度の非特異性は、例示された適用における上記プローブの使用を妨げない。他の適用のためには、これらの配列に結合するプローブ断片の除去、またはさらには同断片のハイブリダイゼーション能力の無能力化が必要である。

【0105】他の適用にとっては、動原体に結合する反復配列、例えばアルファサテライト配列および/またはテロメアは染色体-特異的染色試薬の役目をする事ができる。その中で、標的物質は幾らかのまたは多くの動原体および/またはテロメアをゲノム中に、多分他の染色体領域とともに包含している。かかる適用の典型は次のようなものである。かかる適用において、染色試薬は染色体異常誘発物に起因するランダムな構造的異常を検出するために設計され、かかる誘発物は転座のごとき二動原体および他の構造的異常性をもたらす。ゲノムにおける全動原体、例えば図4Dの染色パターンの形成のために使用されるプローブに結合する配列の添加は、二動原体と転座物質とをより確実に識別することを可能とする。

【0106】本発明に係る染色試薬のゲノムに対する適用は、ゲノムの標的領域にハイブリダイズしたプローブの実質的に均一な分散をもたらす。結合プローブは、ゲノムの標的領域が有効なコントラストに可視化できるならば、「実質的に均一」であるものとみなされる。例えば、もし遺伝子座の多くが細胞の多くの中で可視的であ

るならば、標的物質が可視的に分離された遺伝子座の系統である場合、同標的物質は実質的に均一に染色体される。

【0107】染色体DNAに相補的である核酸断片の塩基配列に関する「実質的部分」(substantial propotions)とは、使用されるハイブリダイゼーション条件のもとで核酸断片が染色体DNAと安定なハイブリッドを形成するほど相補性が十分に広い範囲であることを意味する。特に、かかる文言は、不均一混合物の核酸断片が標的染色体物質に完全には相補的ではない配列のある領域を有している状況を包んでいる。厳格性(stringency)は、ハイブリダイゼーションのために要求された相補性の精度を制御することにより調整することができる。

【0108】本明細書において「中期染色体」(metaphase chromosomes)なる文言は、有糸分裂の中期ステージで凝縮した染色体のみならず他の凝縮した染色体、例えば未成熟(premature)染色体凝縮により凝縮された染色体をも意味するものと定義される。

【0109】核酸配列のハイブリダイゼーション能力を無能力化することは、本明細書においてはときどき、「核酸配列を無能力化すること」と略して書かれる。

【0110】本発明に係る方法および試薬は診断的細胞遺伝学の分野、特に診断的間期細胞遺伝学の分野において特に適した適用を見いだす。癌のごとき疾病に関連する遺伝子再配列を検出することは、本発明に係る染色体特異的試薬および染色方法の特有の適用である。

【0111】隣接する遺伝子症候群は、本発明に係るプローブおよび方法が同定できる遺伝子再配列の例である。隣接する遺伝子症候群は多数のおよび/または減少したコピー数の状態にある、密の間隔に保持された遺伝子の幾多の存在により特徴付けられる。ダウン症候群は隣接する遺伝子症候群の例であり、同症候群には幾多の遺伝子を含む染色体領域の余分のコピーが存在する。

【0112】特に本明細書での記載内容は CMLに関連するBCR-ABL融合物を形成する遺伝子再配列を検出するための染色体特異的試薬および方法の適用である。かかる試薬は疾病特異的、この場合は腫瘍特異的プローブの典型であり、同プローブは直接のおよび/または間接的に標識でき、これにより標的染色体物質に結合したとき可視化される。同標的染色体物質はCMLの場合、CMLに関連することで知られている染色体領域9q34と22q11の転座切断点領域の隣接部位である。本明細書のセクションVI IIに提供された例においては、プローブは標識されて、二重色の蛍光がインシトゥ ハイブリダイゼーションにおける前記プローブの染色パターンに形成される[蛍光インシトゥ ハイブリダイゼーション(FISH)]。しかしながら、染色パターンは他のタイプのシグナルと同様に多くの色で形成でき、その標的物質に結合したプローブを合図する可視化手段は本発明の方法に使用できる。

【0113】本明細書におけるセクションVIIIは、遺伝

子再配列を検出する本発明に係る典型的な方法および試薬を記述している。セクションVIIIの例は、CMLの特性を示すBCR-ABL融合体を形成する遺伝子再配列に関する。かかる例への手引は第9および第22染色体からのアロープを伴うFISHを基礎とするもので、同染色体はCML（図8）の全てのケースに必須である融合したBCRとABLの側面に位置する。アロープは正常および異常の両細胞の染色体物質にハイブリダイズした場合、図8-図12に示すごとく異なる染色パターンを形成する。かかる典型的なアロープにて形成された染色パターンは、正常および異常細胞で異なる。染色パターンの提供(staining pattern present)は、遺伝子再配列が生じると、遺伝子再配列を含まない染色体物質にアロープをハイブリダイズすることにより示された染色パターンの提供とは明確に変えられる。さらに、染色パターンは遺伝子再配列の一種のタイプを他のタイプに対して明確に異ならせる。例えば、本発明に係る核酸アロープのALLに接近した遺伝子再配列を含む染色体物質へのハイブリダイゼーションにより形成された染色パターンは、同アロープのCMLの特性を示すBCR-ABLを含む染色体物質へのハイブリダイゼーションにより形成された染色パターンとは明確に異なる。従って、本発明に係る方法および試薬は類似の疾患の差別診断を提供する。

【0114】セクションVIIIの実施例は、染色パターンにおける蛍光シグナルのアロキシミティに基づくCMLの診断のために提供されるもので、融合物の存在を決定するために1ミクロンの切断点(cutoff point)をたよりとする。シグナルのアロキシミティ距離は、遺伝子再配列の存在を検出するために使用できるシグナルの、多くの特性のうちの特性にすぎない。さらに、アロキシミティ距離は、採用される特定の細胞調製技術および核のサイズに依存し、特定の細胞調製にとっては正常および異常細胞におけるシグナル間の距離に比較的依存する。

【0115】セクションVIIIの実施例で例示された染色パターンは、アロープ方法の典型的なタイプである。多くの他のアロープ方法が採用できる。図11A-図11Fは遺伝子再配列を検出するためのいくつかの他の典

略語

BN	—	NP-40を伴うヒカーボネート緩衝液
DAPI	—	4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール
DCS	—	フルオロセイン-アビディンDCS (フルオロセインAvidan D の商業的に入手できるセルソータグレイド)
AAF	—	N-アセトキシ-N-2-アセチル-アミノフルオレン
EDTA	—	エチレンジアミンテトラアセテート
FACS	—	フルオロセイン-アクチベイトド セルソーティング
FTC	—	フルオロセイン イソチオシアネート
IB	—	分離緩衝液
NP-40	—	Sigma as Nonidet P-40 (St.Louis, MO) から商業的に入手できる非イオン界面活性剤
PBS	—	フォスフェード-ブファード サリン

型的なアロープ方法を示しており、それらのパターンは特定の遺伝子再配列を検出するために変更でき、最適化でき、かつ他の状態に変形できる。

【0116】本発明に係る他の疾病特異的試薬は、CMLとしてセクションVIIIで詳述した方法に類似する。例えば、急性リンパ性白血病(ALL)の診断と研究は、セクションVIIIのBCRアロープ(PEM12)をBC遺伝子の5'末端からのアロープと置き換えることにより遂行される。ALLは、Rh'染色体がその診断において最も一般の細胞遺伝的異常性である故特に興味があり、かかる染色体の存在が非常に攻撃的新生物(aggressive neoplasm)の存在を表示する。

【0117】本明細書、特にセクションVIIIにて例示された方法および試薬は、細胞遺伝学的には類似するが遺伝学的には異なる疾病を識別する手段として提供される。特定の状況における"細胞遺伝的"とは、慣用のバンド分析により確定された類似性に関係する。CMLおよびALLはこのような状況のもとでは、それぞれに関連させる切断点がヒト遺伝子においては互いに密接している故に、慣用的バンド分析ではそれらを識別できず、細胞遺伝学的に類似する。

【0118】さらに、本発明は遺伝子疾患の分子ベースの研究のための細胞遺伝学的探索形式に使用できる方法および試薬を提供する。例えば、人のカリオタイプにおける異常が慣用のバンド分析により示された場合、本発明に係るアロープおよび試薬が同異常の隣接部分における遺伝子再配列を検出するために使用できる。異常の根底をなす分子ベースは本発明に係る方法および試薬により確定でき、遺伝子レベルでもたらされる差異は異なる処置を示唆し、かつ予知的に重要である。根底をなす遺伝子再配列は、人における表現型特性のセットに関連して矛盾なく発見される。

【0119】次のセクションは本発明に係る染色組成物を調製するとともに使用する実施例を提供するが、それは単に例示の目的のためであって本発明を限定する意味ではない。次の略語が使用される。

【0120】

- PI - プロピジウム アイオダイド
 PMSF - フェニルメチルスルホニル フルオライド
 PN緩 - 0.1M NaH_2PO_4 と 0.1M Na_2HPO_4 の混合物
 衝液 pH8 ; 0.1%NP-40
 PNM緩 - 非脂肪ドライミルク (遠心分離) を伴
 衝液 うPN緩衝液 ; 0.02%Naアジド
 SDS - ソジウム ドデシル サルフェート
 SSC - 0.15M NaCl / 0.015M Na サイトレート, pH7
 VNTR - 可変数タンデム反復 (variable number tandem repeat)。

【0121】

【実施例】I. 染色体-特異的染色試薬を調製する方法
 I.A 染色体-特異的DNAの分離とDNA断片ライブラリーの形成

本発明に係る組成物を調製する好ましい第1ステップは、染色体-特異的DNAを分離することである。(この文は上記したごとく標的-特異的および/または領域-特異的DNAを包含するもので、その特異性はDNAの起源に起因する)。同ステップは第1に、染色組成物が導かれる十分な量の特定の染色体タイプまたは染色体サブリジョンを分離すること、その後分離された染色体または染色体サブリジョンからDNAを抽出することを含む。ここで"十分な量"とは本方法のその後のステップを遂行するに十分な量のことを意味する。好ましくは、抽出されたDNAは標準的な遺伝子工学技術を用いてクローニングすることによりDNAインサートを形成するために使用される。

【0122】好ましいクローニングベクターは、限定はされないけれども酵母人工染色体(YACS)、プラスミド、バクテリオファージおよびコスミドを含む。好ましいプラスミドはブルースクライプ プラスミドである。好ましいバクテリオファージはラムダ インサージョンベクターであり、より好ましくはカロン4A(Charon 4A)、カロン21A(Charon 21A)、カロン35(Charon 35)、カロン40(Charon 40)およびGEM11である。好ましいコスミドはロウリスト4(Lawrist4)、ロウリスト5(Lawrist5)およびsCos1を含む。

【0123】上記したごとく、DNAはいくつかの源から分離できる。染色体-特異的染色試薬は本発明により植物および動物両者のDNAから調製できる。動物DNAの重要な源は哺乳動物特に霊長類またはゲシ動物であり、その中では霊長類の源は特にヒトおよびモンキーであり、ゲシ動物の源は特にラットまたはマウスであり、特にマウスである。

【0124】1. 全染色体 (entire chromosome) からDNAを分離すること。

特定の全染色体 (whole chromosome) (特異的染色体タイプ) を分離するための好ましい手段は、インターフェースフック ハイブリッドセル システムを使用するか否かにかかわらず、中期染色体のダイレクト フロー ソーティング (フルオロセンス-アクティブイティド セル ソーティング) による手段である。ある種にとって、全ての

染色体は慣用の有効なソーティング技術により分離できる。全てではないが、多くのヒト染色体は一般にフローソーティングによりヒト細胞から分離できる。[Carra no et al., "Measurement and Purification of Human Chromosomes by Flow Cytometry and Sorting", Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 76, pp. 1382-1384 (1979)]。従って、ヒト染色体の分離にはヒト/ゲシ動物 ハイブリッドセル システムが必要である。[Kao, "Somatic Cell Genetics and Gene Mapping", International Review of Cytology, Vol. 85, pp. 109-146 (1983); Gusella et al., "Isolation and Localization of DNA Segments from Specific Human Chromosomes", Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 77, pp. 2829-2833 (1980)] を参照。染色体ソーティングは商業的に入手できるフルオロセンス-アクティブイティド ソーティングマシン、例えばベクトンディキンソン FACS-II (Becton Dickinson FACS-II)、カウルトーエピシス V ソータ (Coulter Epics V sorter)、または染色体ソーティングに活用できる特殊目的のソータまたはこれに類似する機器により行われる。

【0125】DNAは分離された染色体から、例えばマーマル等の標準技術により抽出される。[Marmur, "A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Micro-Organisms", J. Mol. Biol., Vol. 3, pp. 208-218 (1961); Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982) p. 280-281]。これらの引用文献はDNA分離技術の叙述のために参考文献として取り入れられる。

【0126】分離された染色体-特異的DNAからのインサートライブラリーの世代は、例えば下記に文献に示す標準的遺伝子工学技術を使用することにより遂行される。[Davies et al., "Cloning of a representative Genomic Library of the Human X Chromosome After by flow Cytometry", Nature, Vol. 293, pp. 374-376 (1981); Krumlauf et al., "Construction and Characterization of Genomic Libraries from Specific Human Chromosomes", Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 79, pp. 2971-2975 (1982); Lawn et al., "The Isolation and Characterization of Linked Delta-and-Beta-Globin Genes from a Cloned Library of Human DNA.", Cell, Vol. 15, pp. 1157-1174 (1974); and Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", (Cold Spring Harbor Laboratory

y, 1982), pp. 256-308; Van Dilla et al., id.; Fuscoe, Gen e, 52:291 (1987); and Fuscoe et al., Cytogenet. Cell Ge net., 43:79 (1986). これらの文献は参考文献として本明 細書に取り入れられる。

【 0127】 ヒト染色体のそれぞれのための組換え DNA ライブラリーは ナショナル ラボラトリー ジーン ライ ブラリー プロジェクト (National Laboratory Gene Lib raryProject)によって考案され、アメリカン タイプ カルチャー コレクション (American Type Culture Coll ection)から入手できる。 [Van Dilla et al., Biotechn ology, 4:537 (1986).]。小インサート-含有ライブラリ ー (small insert-containig libraries)は、Hind IIIま

たはEcoRIを伴うフローソートされたヒト染色体ゲノムD NAの完全なダイジェクションにより構成され、ラムダ イ ンサーション ベクター カロン21Aにてクローニングさ れる。ベクターは9.1kbのサイズまでのヒトインサート を受入れることができる。従って、9.1kb より大きいHi nd III (またはEcoRI)制限断片は、これらのライブラリ ーから取り戻すことができない。これらのラボラトリー における観測された平均挿入サイズは約4kbである。Hin d III染色体-特異的ライブラリーとそれらのATCC 登録 番号を伴う代表的リストが [表1] に示される。

【 0128】

【表1】

(表9) 03-199564 (P2003-199564A)

カロシ21Aベクターにおけるト染色体特異

的ゲノムライブラリー

染色体	ATCC#	ライブラリー
1	57753	LL01NS01
1	57754	LL01NS02
2	57744	LL02NS01
3	57751	LL03NS01
4	57700	LL04NS01
4	57745	LL04NS02
5	57746	LL05NS01
6	57701	LL06NS01
7	57755	LL07NS01
8	57702	LL08NS02
9	57703	LL09NS01
10	57736	LL10NS01
11	57704	LL11NS01
12	57756	LL12NS01
13	57705	LL13NS01
13	57757	LL13NS02
14	57706	LL14NS01
14/15	57707	LL19NS01
15	57737	LL15NS01
16	57758	LL16NS03
17	57759	LL17NS02
18	57710	LL18NS01
19	57711	LL19NS01
20	57712	LL20NS01
21	57713	LL21NS02
22	57714	LL22NS01
X	57747	LL0XNS01
Y	57715	LL0YNS01

【0129】選別された染色体タイプから抽出されたDNAは、ベクター中で同DNAをクローニングするよりはむしろポリメラーゼ鎖反応(PCR)によるか、または同DNAを細胞系で増殖することにより増幅できる。PCRの調整においては、抽出されたDNAに適当なファージの尾部が添加される。かかるPCRの手法に関連した事項が後述のセクションI.B.で述べられている。

【0130】ハイブリッドセルから所望の配列を分離する他の実行できる方法は、シュメックペーバ(Schmeckpeper)等の下記の方法を含む。[Schmeckpeper et al.,「P

artial Purification and Characterization of DNA from Human X Chromosome」, Proc.Natl.Acad.Sci.,Vol.76, pp.6525-6528(1979);Olsen et al.,supra(in Background)。それ故、これらの文献は参考文献として取入れられている。

【0131】2. 染色体の一部からDNAを分離すること。領域-特異的染色体DNAを分離するのに使用できる方法には、下記の方法が含まれる。前もってマップ化されたDNA、例えばマップ化されたコスミドのライブラリーからの適宜の染色体領域の選択：例えばFACSによる誘導染色

体のソーティング：選択された染色体の微視的解体：減ハイブリダイゼーション：所望の染色体断片を含み、DNAを抽出するとともに増幅し、かつ所望の増幅されたDNAを選択する適宜のハイブリッドセルの同定：放射線ハイブリッドからの適宜の染色体物質の選択。サブセクションI.A.1で概略的に記載した標準的遺伝子工学技術は、本技術分野の周知の手法で使用される。領域-特異的DNAの増幅は、適宜のベクターでクローニングすることにより、適宜の細胞系で増殖することにより、および/またはPCRの使用により遂行できる（後述のI.B.を参照）。

【0132】染色体領域-特異的DNAを分離する好ましい方法は、長いDNA配列のライブラリーをプローブするマップ化された短いDNA配列を使用することであり、長いDNA配列のライブラリーは通常なるベクターでクローン化される。例えば、プラスミドでクローン化されたプローブは、コスミドまたは酵母人工染色体（YAC）ライブラリーをプローブするために使用できる。イニシヤルシードプローブ（initial seed probe）を使用することにより、より長いインサートライブラリーにおける重複クローンを見いだすことができ（「ウォーキング」（walking）とよばれる方法）、より高度なコンプレキシティプローブはシードプローブを取り巻く染色体領域の確実な染色を形成できる。結局、種のための全ゲノムがマップ化されると（例えばヒト種のためにヒューマンゲノムプロジェクトにより）、種の全ゲノムのために配列されたクローニングが有効である。その後、所望の特異性プローブを形成するために、適宜クローンを容易に選択できる。

【0133】染色体の1または複数の領域（または全染色体）からDNAを分離する他の方法は、適宜の細胞系（例えば、ヒト/ハムスタハイブリッドセルのごときハイブリッド細胞系）において、かかる染色体の1または複数の領域を増殖し、細胞系からDNAを抽出し、それを適宜のベクターでクローン化し、かつライブラリーを形成するためにヒトDNAを含むクローンを選択することである。ハイブリッドセルが使用される場合、ヒト染色体物質を含むハイブリッド中の染色体はクローニングする以前に、ライブラリー中でヒトクローンの頻度を増大するためにフローソーティング（FACS）により分離される。なおさらに、図6に例示のごとく、ハイブリッドからの全てのDNAは分離でき、さらにクローニングすることなく標識化でき、かつプローブとして使用できる。

【0134】3. 一重鎖プローブ

あるケースにおいては、不均一混合物の核酸断片は一重鎖RNAまたはDNAからなることが好ましい。ある条件のもとでは、一重鎖核酸プローブの結合効率（binding efficiency）は例えばコックス等の下記の文献に示されているように、インシトゥハイブリダイゼーションの間により高くなることが発見された。[Cox et al., "Detection of mRNAs in Sea Urchin Embryos by In Situ Hybr-

idization Using Asymmetric RNA Probes", *Developmental Biology*, Vol.101, pp.485-502(1984)]。

【0135】分離されたDNA断片からRNA断片を生み出すためには、標準的な方法が使用される。例えば文献[Cell, Vol.32, pp.681-694(1983)]にて記述されているグリーン等により発展された方法は、プロメガバイオテック（Promega Biotec）[Madison, WI]から商品名「リボプローブ」（Riboprobe）として商業的に入手できる。本発明とともに使用する好ましい他の転写キットは、商品名「ジェネスクライプ」（Genescribe）としてユナイテッドステイトバイオケミカルコーポレーション（クレベランド，OH）（United States Biochemical Corporation）から入手できる。一重鎖DNAプローブは一重鎖バクテリオファージM13にて形成することができ、例えばベセスダリサーチラボラトリー（ガイサーバーグ，MD）（Bethesda Research Laboratories）（Gaithersburg, MD）等のキットホームの状態で入手できる。図4に示すハイブリダイゼーションは、ブルースクライブプラスミドベクター（ストラタジェン，ラジョラ，シーエー）（Stratagene, La Jolla, CA）中でサブクローンされた[表1]のライブラリーで遂行された。ブルースクライブプラスミドはRNAプロモータを含み、同RNAは一重鎖プローブの形成を可能とする。

【0136】後述のセクションIXは非自己相補的一重鎖核酸プローブを調製し、かつ適用する方法を提供する。同プローブはプローブの非特異的および不適当な結合を減すことにより、インシトゥハイブリダイゼーションで達成し得るシグナル/ノイズ比を改良する。さらに、かかるセクションは二重鎖標的核酸を変性する方法を提供する。同二重鎖標的核酸はハイブリダイゼーションに有効な一重鎖領域を最小にし、プローブ配列に非相補的である。簡単にいえば、プローブはDNAを、DNAポリメラーゼのための鋳型/プライマーを形成する制限酵素とエキソヌクレアーゼとで処理することにより構成される。ダイジェストされた鎖は標識されたヌクレオシドトリホスフェート前駆体の存在のもとで再合成され、標識された一重鎖断片はプローブを形成するために再合成された断片から分離される。標的核酸は、プローブを構成するために使用したものと同様の制限酵素で処理され、かつプローブの適用以前にエキソヌクレアーゼで処理される。

【0137】I.B. PCR

本発明に係るプローブを形成する他の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応[PCR]の使用を含む。[PCRのメカニクの説明として、Saiki et al., *Science*, 230:1350(1985), U.S. Pat. Nos. 4,683,195, 4,683,202(1987, 7, 24), 4,800,159(1989, 1, 24)]。上記のごとく、分離された標的-特異的核酸配列はPCRによって増幅でき、反復配列の少ないまたは皆無である標的-特異的配列を形成する。かかる手法に使用されたPCRプライマーは、反復配列の末端の

ためのものであり、反復物によりフランクされた配列の増幅をもたらす。

【0138】図7はPCRを使用するかかる方法を示しており、かかる方法において典型的な反復配列はAluである。ショート セグメントのみが増幅される場合には、そのような配列は他の反復物を含まないものと思われ、従って反復配列の減少されたDNAを提供する。

【0139】それはさらに、相補的配列の前記反復配列に対する最初のハイブリダイジングにより、かかるPCR手法における反復配列の形成を抑制でき、かかる手法において前記相補的配列は非相補的フランキング エンド (flanking end) を拡張するか、またはポリメラーゼによって拡張を許さないヌクレオチドにターミネートされる。ブロッキング配列の非相補的末端は、PCRプロセスの間ブロッキング配列をPCRプライマーとして機能することから抑制する。

【0140】II. 反復配列の除去および/または反復配列のハイブリダイゼーション能力の無能力化すること、本発明に係るプローブは典型的には、以下の幾多のステップにより形成される。ゲノムの標的領域に相補的である核酸配列源を得るステップ。同配列が標的物質に能率的にハイブリダイズしかつそれらが結合した後検出し得るように、同配列を標識またはその他の処理を行うステップ。ハイブリダイゼーション能力を無能力化または共有反復配列の十分な量を除去し、またはかかる配列を無能力化しかつ除去すべく同配列を処理するステップ。これらのステップの順序は、採用される特定の方法に依存する。

【0141】共有反復配列の除去、および/またはかかる反復配列のハイブリダイゼーション能力の無能力化をおこなうには、次の方法が使用できる。これらの方法は典型的なものであって、当業者の周知の手法で模式的に説明されており、かつこれらの方法は当業者の周知のパラメータおよび手法に応じて変更および拡張できる。

【0142】1. シングルコピー プローブ
シングルコピー プローブは、ゲノムの標的領域に含まれるシングルコピー配列に相補的である核酸断片からなりたっている。かかるプローブを構成する方法は、標的領域をクローニングにより形成されたDNAライブラリーで始めることである。ライブラリーにおけるクローンの中には、全配列がシングルコピーであるDNAを含むであろうし、他のものは反復配列を含むであろうし、またさらに他のものはシングルコピー配列および反復配列の部分を持つであろう。個々のクローンによる選択、およびシングルコピー配列のみを含んでいるこれらのクローンのアッシングは、標的領域に特異的にハイブリダイズするプローブをもたらす。クローンのシングルコピーの性質は最終的には、標準技術を使用するサザンハイブリダイゼーションにより確認される。図4Hは、第4染色体ライブラリーからこの方法で選択された120ク

ローンによるハイブリダイゼーションを示す。

【0143】サザン法分析は非常に時間を消費し、かつ緊張する労働である。それ故、完全ではないにしても、候補的 (candidate) シングルコピー クローンを得るためのより効率的なスクリーニング方法が有用である。セクションV.B.においては、改良された方法の実施例は反復DNAの存在のために、個体ファージおよびプラスミドクローンをスクリーニングするために提供され、それはゲノムDNAによるハイブリダイゼーションを使用するものである。プラスミド クローンのスクリーニングはより効率的であり、選択されたクローンの約80%がシングルコピー配列のみを含んでいる。残りは低度コピー反復物である。しかしながら、かかる方法で調製されたプローブは十分な染色コントラストを形成でき、低度コピー反復配列がプローブ中に許容できることを示している (当セクションのサブセクション3を参照)。

【0144】クローン手法によるクローンの不利益は、クローンが含んでいる配列の一部がたとえ反復配列であるとはいえ、同クローンが捨てられるということである。クローン化された核酸の長さが長いほど、同核酸が反復配列を含む機会は多くなる。それ故、核酸が大きなインサート例えばコスミド、YAC等を含むベクター中で、またはハイブリッド セルのごとき細胞系で増殖される場合には、シングルコピー選択が行われる以前に同核酸を小さな断片にサブクローンすることが有利である。上記した選択手法は共有反復配列と特異的反復配列とを区別するものではない。いずれか一方のタイプの検出可能な反復配列を伴うクローンは プローブには使用されない。

【0145】2. ハイブリダイゼーション特性の個体試験

核酸のピース、例えばクローンのハイブリダイゼーション特異性は、インシトゥ ハイブリダイゼーションにより試験できる。適宜のハイブリダイゼーション条件のもとで、上記ピースが所望の標的領域としての特異的なシングルコピーまたは反復配列に結合するならば、同ピースはプローブに包含できる。染色体-特異的反復配列 [Trask et al., supra, (1988) and references therein], VNTRs, 多数のマッピングされたシングルコピー配列等のごとく、特異的ハイブリダイゼーション特性を持っている多くの配列がすでに知られている。もっと多くのものが連続的にマッピング化されている。かかる配列は本発明のプローブに包含できる。

【0146】3. 集団固定法 (Bulk Procedures).
ヒトゲノムのごとく多くのゲノムにおいて、共有反復DNAの主要部分はAluのごとき高度に反復された配列の若干のファミリーに含まれている。このような高度コピー反復配列を実質的に含んでいないプローブは、多くの適用において有効な染色コントラストを形成するであろう。かかるプローブは核酸配列のある源、例えば第1表のラ

イブラリーから比較的簡単な集団固定法で形成できる。それ故、かかる集団固定法はかかる適用にとって好ましい方法である。

【0147】これらの方法は先づ第1に、相補的核酸鎖の濃度が増加するほど同鎖のハイブリダイゼーション率が増加するという事実を促進する。従って、核酸断片の不均一混合物がハイブリダイゼーションを許容する条件のもとで変性されかつインキュベイトされる場合には、高濃度で存在する配列は他の場合に比較してより早く二重鎖になるであろう。二重鎖核酸はその後除去され、残りのものがプローブとして使用できる。部分的にハイブリダイズした混合物はアプローブとして使用できるが、二重鎖配列は標的物質に結合し得ない。次の方法は本発明に係る標的-特異的染色を形成するのに有効な集団固定法の典型的な方法である。

【0148】3a. プローブの自己再結合

ハイブリダイゼーション混合物における二重鎖アプローブ核酸は変性され、その後ハイブリダイゼーション条件のもとで高度コピー配列のための十分な時間アプローブ中でインキュベイトされて、実質的に二重鎖配列となる。ハイブリダイゼーション混合物はその後サンプルに適用される。高度に反復された配列の残留している標識された一重鎖コピーは、サンプルのいたるところに結合し、弱くかつ幅広く分散されたシグナルを形成する。ゲノムの標的領域のための特異的な低度コピー配列の多様な結合は、容易に識別し得る特異的シグナルを形成する。

【0149】かかる方法は、染色体のアプローブとして第4染色体および第21染色体 (pBS4とpBS21) のための、染色体-特異的ライブラリーを用いた後述のセクションVI、Bに例示されている。[Pinkel et al., PNAS (USA) 85:9138-9142 (December 1988)]。1-10ng/ μ lの範囲のアプローブ濃度を含んでいるハイブリダイゼーション混合物はサンプルに適用される以前に、アプローブを変性するために加熱されかつ37°Cで24時間インキュベイトされた。

【0150】3b. ブロッッキング核酸の使用

ハイブリダイゼーション混合物には、ハイブリダイゼーション能力を抑制することが望まれる配列と相補的である標識されない核酸配列が添加される。必要によりアプローブおよびブロッッキング核酸は変性され、また適宜のハイブリダイゼーション条件のもとでインキュベイトされる。ブロックされるべき配列は他のものより早く二重鎖配列になるため、ハイブリダイゼーション混合物が標的物質に適用される場合には同標的物質に結合することはできない。あるケースにおいては、ブロッッキング反応はインキュベイト期間が極めて短縮できるほど早く生じ、ハイブリダイゼーション混合物が変性後直ちに標的物質に適用される場合には十分な結果が得られる。ブロッッキング方法は一般にシーリー等により下記の文献に記述され、かかる文献は参考文献として取り入れられる。[Sealy et al., "Removal of Repeat Sequence from Hybrid

ization probes", Nucleic Acid Research, 13:1905(1985)]。ブロッッキング核酸の実施例はゲノムDNA、ゲノムDNAの高度コピーフラクションおよび下記(i-iii)に概略的に示したごとく特定の配列を含んでいる。

【0151】3b.i. ゲノムDNA

ゲノムDNAは生物の核酸配列の全てを、それらのゲノムにおけるコピー数に比例して含む。従って、ゲノムDNAをハイブリダイゼーション混合物に添加することは、高度コピー反復配列の濃度を低度配列より増加し、それ故前者をブロッッキングするのにより効果的である。しかしながら、ゲノムDNAは標的物質に対して特異的である配列のコピーを含み、同ゲノムDNAがあまりにも多く添加される場合には所望の染色体-特異的結合を減少するであろう。添加すべきゲノムDNA量を決定するガイドライン(後述の3.e.項のQの概念を参照)、およびゲノムブロッッキングDNAを使用する実施例は下記に提供される。ゲノムDNAのブロッッキング効果性はある条件のもとでは、そのハイブリダイゼーション混合物への添加タイミングの調整により高めることができる。かかるタイミング調整の実施例は、後述の図4B~図4E(プロトコルI)および図4F(プロトコルII)に示されたプロトコルIおよびプロトコルIIハイブリダイゼーションで提供され、またセクションVIに詳述されている。

【0152】3b.ii. ゲノムDNAの高度コピーフラクション

ゲノムDNAの使用での難しさは、同ゲノムDNAもまた低度コピー配列のハイブリダイゼーションをブロックすることであり、かかるブロックは所望の標的染色を与える配列に対して支配的である。従って、単に高度コピー配列のみを得るためにゲノムDNAを分別すること、およびこれらをブロッッキングに使用することはこの困難性を克服する。かかる分別は例えば、後述(3c.i.)するごとくハイドロオキシアパタイトで行うことができる。

【0153】3b.iii. 特異的配列

プローブにおける特定の配列のブロッッキングは、同配列の標識されないコピーを多く添加することにより成し遂げられる。例えば、プローブにおけるAlu配列は、クロン化されたAluを添加することによりブロックできる。ヒトゲノムにおける最高度コピー配列を含んでいるわずかなクロンの混合物から調製されたブロッッキングDNAは、染色体-特異的ライブラリー例えば[表1]のライブラリーとともに効果的に使用できる。1または複数の染色体-特異的ライブラリーからの標識されない核酸配列は、1または複数の他の染色体-特異的ライブラリーからの標識された配列を含んでいるプローブをブロックするのに使用できる。共有配列はブロックされ、標的染色体上にのみ存在する配列は影響されない。図4Fは、ゲノムDNAがヒト第21染色体および他の末端動原体型染色体の動原体型領域により共有された配列、または配列類のハイブリダイゼーションを完全にブロッッキング

するには効果的ではないことを示している。これらの配列または配列類を含んでいるクローンまたはクローンズが最終的に分離されると、これから形成された標識されないDNAは染色の特異性を改良するためにゲノムブロッキングDNAに添加される。

【0154】3c. 配列の除去

3c.i. ハイドロキシアパタイト
一重鎖核酸および二重鎖核酸は、ハイドロキシアパタイトに対して異なる結合特性を持っている。かかる特性は核酸を分別するのに一般的に使用される基礎を提供する。ハイドロキシアパタイトは商業的に入手できる (eg. Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)。最高度コピー数からシングルコピー数までの反復の特定の度合の配列を含んでいるゲノムDNAのフラクションは、ゲノムDNAを変性し、それを適宜の条件のもとでC₀tの特定の値に再結合することを許容することにより得られ、それに続いてハイドロキシアパタイトを使用する分離に付される。一重鎖核酸および二重鎖核酸もまた、S1ヌクレアーゼの使用により識別できる。かかる技術およびC₀tの概念はブリテン等により以下の文献に説明されており、かかる文献は参考文献として本明細書に取り入れられている (Britten et al., "Analysis of repeating DNA Sequences by Reassociation", in *Method in Enzymology*, Vol. 29, pp. 363-418 (1974))。

【0155】上記した3a. または3b. にて形成された一重鎖核酸フラクションは、ハイドロキシアパタイトにより分離でき、かつアプローブとして使用できる。従って、ブロックされた配列 (二重鎖となる) は物理的に除去される。その後、アプローブは必要とするまで保存される。その後、アプローブは添加ブロッキング核酸なしに使用でき、またはその染色コントラストは多分添加ブロッキング核酸により改良できる。

【0156】3c. ii. 固定された核酸による反応
特定の配列の除去は、一重鎖「吸収」(absorbing)核酸配列をソリッドサポート(solid support)に付着することによっても遂行できる。一重鎖源核酸は固定された核酸にハイブリダイズされる。ハイブリダイゼーション後、未結合配列は収集されアプローブとして使用される。例えば、ヒトゲノムDNAはヒトアプローブから反復配列を吸収するために使用できる。かかる方法の一つの方法がブリソン等により以下の文献に記述されており、かかる文献は参考文献として取り入れられている。[Brisonet al., "General Method for Cloning Amplified DNA by Differential Screening with Genomic Probes", *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 2, pp. 578-587 (1982)]。簡単に言えば、わずかに奪い取られたヒトゲノムDNAは、ジアゾニウムセルロースまたはその類似のサポートに結合される。断片に適宜にカットされた源DNAは固定されたDNAに対してハイブリダイズされ、約1~100のC₀t値になる。ハイブリダイゼーション条件の好まし

いストリンジェンシーは、DNAのベース組成により変化する。かかる手法は染色体-特異的ライブラリー、例えば[表1]のライブラリーから反復配列を除去し、全ヒト染色体を染色し得るプローブを形成する。

【0157】3d. 標的ゲノムにおける非標的配列をブロックすること

標的ゲノムにおける非標的結合座位を、標識されない相補的反復配列によるハイブリダイゼーションを行うことによりブロックすることは、結合する潜在力を持つアプローブにおける標識された配列の結合を阻止する。例えば、標識されないゲノムDNAによるハイブリダイゼーションは、標的ゲノム二重鎖に高度コピー反復配列を与える。アプローブにおけるかかる配列の標識されたコピーは、アプローブがその後適用される場合結合することができない。

【0158】実際に染色コントラストを形成するためには、多くのメカニズムが組み合わさっている。例えば、ブロッキングDNAが上記3bに示したごとくアプローブに添加されると、同DNAは一重鎖配列として留まり、アプローブが標的物質に適用される場合には標的配列に結合でき、かつ同標的配列をブロックできる。ブロッキングDNAをとまうアプローブのインキュベイトが最小限である場合には、その後ゲノムDNAは同時にアプローブをブロックし、かつアプローブと標的物質における結合座位を競う。

【0159】3e. Qの概念

上記3b.i. セクションで示したごとく、アプローブにおける高度コピー反復のハイブリダイゼーション能力を抑制することと、標的-特異的配列の結合を抑制することによる所望のシグナル強度を減らすこととの間の最適な妥協を図るためには、正確な量のゲノムDNAを添加することが必要である。次のディスカッションは、ゲノムの標的領域からのDNAをクローニングすることにより形成された、または同DNAの広がり(stretches)をクローニングとは異なる他の複製により形成されたアプローブをとまうゲノムブロッキングDNAの使用に関するものである。従って、アプローブはシングルコピー、染色体-特異的反復配列、および標的において発見される共有反復配列の典型的なサンプリングを含んでいる。かかるアプローブは、コンプレキシティがゲノムの小さな領域 例えはいくつかの接近されたコスミドクローンから誘導された100kbから、例えば[表1]からの多数のライブラリーのコンビネーションである数億ベースまでの範囲のものである。下記のディスカッションは例示的であり、異なる核酸が使用される他の状況にまで拡大できる。下記のQのディスカッションは、本発明を如何に進行すべきかに関する一般的なガイドラインを与えることのみを意図したものである。

【0160】標識されたアプローブ配列を含んでいるハイブリダイゼーション混合物への標識されないゲノムDNA

の添加は、全配列の濃度を増大するが、共有配列がゲノムの他の場所で見つかるのに対して標的-特異的配列が見つからないことから、標的-特異的配列の濃度よりも大きなファクターにて共有配列の濃度を増大する。従って、共有配列の再結合が優先的に増大され、これにより標的物質に対する共有配列の標識されたコピーのハイブリダイゼーションは優先的に抑制される。

【0161】この概念を定量化するために、[表1]の第*i*染色体ライブラリーからのプローブDNAのマス m_i (mass m_i)と、標識されないゲノムDNAの m_0 とを含んでいるハイブリダイゼーション混合物中の第*i*染色体に特異的にハイブリダイズする配列、反復またはシングルコピーについて最初に考慮する。配列の標識されたコピーの数は m_i に比例する。一方、標識されないコピーは $f_i m_0$ に比例する。但し、 f_i は第*i*染色体上に含まれたDNAのフラクションである。従って、標的染色体にとつての配列特異的な各々の標識されたコピーに対する標識されないコピーの比率は $f_i m_i / m_0$ であり、これは本発明においてQとして規定される。正常のヒト染色体においては、 $0.016 \leq f_i \leq 0.08$ である。[Mendelsohn et al., Science, 179:1126(1973)]。典型的な実施例として、セクションV1.B.では $f_i = 0.066$ と $f_{i1} = 0.016$ が示されている。L塩基対からなる領域に標識されたプローブとしては $f_i = L/G$ である。但し、Gはゲノム中の塩基対の数である(ヒトおよびその他の哺乳動物においては約 3×10^9)。従って、 $Q = (L/G) (m_i / m_0)$ である。

【0162】ゲノム全体にわたって多かれ少なかれ均一に分散される共有配列、例えばAluについて考慮する。標識されたコピーの数は m_0 に比例するのに対して、標識されないコピーの数は m_0 に比例する。従って標識されたコピーに対する標識されないコピーの比率は $m_0 / m_0 = Q/f_i$ である。これは、コピー数にかかわらず全て均一に分散された配列にとって正しい。従って、添加するゲノムDNAはファクター $(1+Q)$ により各特異的配列の濃度を増大し、これに対して各均一分散された配列はより大きなファクター $(1+Q/f_i)$ により増大する。従って、共有配列の再結合比率は、ゲノムDNAの添加により特異的配列の再結合比率よりより大きなファクターにより増大される。

【0163】相対的再結合比率におけるゲノムDNAの有益な効果のおおよそ半分は、 $Q=1$ で達成され、 $Q=5$ となると、さらに増大することにより得られるべき利益はもはや本質的にはないが示される。従って、後述のセクションVI.B.のプロトコル1ハイブリダイゼーションは $Q \leq 5$ を保持する。

【0164】ゲノム ブロッキングDNAの使用を例示するには、ゲノムのモデルを考慮するのが便利であって、同モデルにおいてはDNAの50%が特異的配列(反復およびシングルコピーの両者)であり、DNAの他の50%はゲノム全体にわたって均一に分散している共有反復配列である。従って、モデルによると、標的物質がL塩基であ

る場合(すなわち、プローブがゲノムの標的領域のL塩基である断片を含む)、L/2塩基を含んでいる配列は標的物質に対して特異的であり、かつL/2は全ゲノムと共有される。

【0165】III. 不均一混合物の核酸断片を標識すること。

不均一混合物の一重鎖および二重鎖核酸断片を標識するにはいくつもの技術がある。これらの方法は放射線の標識の結合を含んでいる。例えば、ハーバー等[Harper et al., Chromosoma, Vol.83, pp.431-439(1984)]；フルオロクロムまたは酵素の直接付着(direct attachment)、例えばスミス等[Smith et al., Nucleic Acids Research, Vol.13, pp.2399-2412(1986)]、およびコノリイ等[Connolly et al., Nucleic Acids Research, Vol.13, pp.4485-4502(1985)]；免疫化学的または他のアフィニティリアクションにより核酸断片を検出し得るようにする同断片の種類の化学的変更、例えばテン等[Tchen et al., Chemically Modified Nucleic Acids as Immunodetectable Probes in Hybridization Experiments, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol.81, pp.3466-3470(1984)]；リチャードソン等[Richardson et al., Biotin and Fluorescent Labeling of RNA Using T4 RNA Ligase, Nucleic Acids Research, Vol.11, pp.6167-6184(1983)]；ランガー等[Langer et al., Enzymatic Synthesis of Biotin-Labeled Polynucleotides: Nucleic Acid Affinity Probes, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol.78, pp.6633-6637(1981)]；ブリガティ等[Brigati et al., Detection of Viral Genomes in Cultured Cells and Paraffin-Embedded Tissue Sections Using Biotin-Labeled Hybridization Probes, Virology, Vol.126, pp.32-50(1983)]；ブローカー等[Broker et al., Electron Microscopic Visualization of tRNA Genes Ferritin-Avidin: Biotin Labels, Nucleic Acids Research, Vol.5, pp.363-384(1978)]；ベヤー等[Bayer et al., The Use of the Avidin Biotin Complex as a Tool in Molecular Biology, Methods of Biochemical Analysis, Vol.26, pp.1-45(1980)]；クルマン[Kuhlmann, Immunoenzyme Techniques in Cytochemistry (Weinheim, Basel, 1984)]；ランガー-サファー等[PNAS USA, 79:4381(1982)]；ランデグント等[Exp. Cell Res., 153:61(1984)]；ホップマン等[Hopman et al., Exp. Cell Res., 169:357(1977)]。典型的な標識化手段はこれらを含み、これらの手段においてプローブ断片はビオチニル化され、N-アセトキシ-N'-2-アセチルアミノフルオレンで変更され、フルオロセインで変更され、水銀/TNPリガントで変更され、スルホン化され、ジゴキシゲニン化され、またはT-Tダイマを含む。

【0166】「プローブ標識化」(probe labeling)のキイとなる特徴は、標的物質に結合したプローブが検出できるということである。あるケースでは、付加された特

微よりもプローブ核酸の固有の特徴がこの目的のために利用できる。例えば、特異的にRNA/DNAデュプレックスを見いだす抗体は、DNA標的物質に結合されるRNAから作られたプローブを確認する能力を持つことを証明されている。[Rudkin and Stollar, Nature, 265:472-473 (1977)]。かかるプローブのために使用されたRNAは変更されない。プローブ核酸断片は、変更されたヌクレオチドまたは特定の正常なヌクレオチドの尾部を付加することにより拡張できる。正常ヌクレオチドの尾部が使用される場合には、数ある標識する手段の中で、尾部に相補的でありかつフルオロクロム、酵素、放射能、変更塩基対を含んでいる核酸による第2のハイブリダイゼーションが結合プローブの検出を可能とする。かかるシステムは商業的にはエンゾ バイオケムから入手できる。

【0167】プローブにおける核酸配列が変異構成物を直接誘導することのない、結合プローブを可視化する手段の他の実施例は、チミジンダイマーに対する抗体の使用である。ナカネ等 [20(2):229 (1987)] は、その中でチミジン-チミジンの二量体DNA (T-TDNA) がインシトゥ ハイブリダイゼーションのためのマーカとして使用された方法を例示している。ハイブリダイズされたT-TDNAはラビット抗-T-TDNA抗体を使用して免疫組織化学的に検出された。

【0168】上記文献に記載された標識化技術の全ては、特定の状況のもとで選択される。それ故、上記文献は参考文献として取り入れられる。さらに、当業者にとって周知の標識化技術は、本発明にかかる染色組成物を標識するのに有用である。標識化手段の選択は、下記のファクターを含む幾多のファクターにより決定される。ハイブリダイゼーションの効率における標識効果および染色体DNAに対する核酸断片の結合効果、最初のハイブリダイゼーション後に適用されるラベリング モイエティ (labeling moieties) への結合プローブの隣接性、ラベリング モイエティの相互の適合性、標識により引き起こされたシグナルの性質と強度、標識が適用される費用および容易性、これらに類似する事項。

【0169】異なる方法によりそれぞれ標識された幾多の異なる高度コンプレキシティ プローブは、同時に使用できる。それ故、異なるプローブの結合は例えば異なる色により識別される。

【0170】IV. インシトゥ ハイブリダイゼーション染色体に対する本発明に係る不均一混合物の適用は、標準的なインシトゥ ハイブリダイゼーション技術により遂行される。技術上の幾多の優れたガイドが役に立つ。例えばガルおよびパードウ [Gall and Pardue, "Nucleic Acid Hybridization in Cytological Preparation s", Methods in enzymology, Vol. 21, pp. 470-480 (1981)]、例えばヘンダーソン [Henderson, "Cytological Hybridization to Mammalian Chromosomes", International Review of Cytology, Vol. 76, pp. 1-46 (1982)] ;

例えばアンゲラー等 [Angerer, et al., "In Situ Hybridization to Cellular RNAs", in Genetic Engineering: Principles and Methods, Setlow and Hollaender, Ed s., Vol. 7, pp. 43-65 (Plenum Press, New York, 1985)]。したがって、これらの文献は参考文献として取り入れられる。

【0171】以下の3つのファクターがハイブリダイゼーション プローブの染色感受性 (staining sensitivity) に影響を及ぼす。(1) ハイブリダイゼーションの効率 (プローブによりハイブリダイズできる標的DNAのフラクション)、(2) 検出効率 (すなわち、ハイブリダイゼーション プローブの与えられた量から得られる可視化シグナルの量)、(3) プローブの非特異的結合または検出システムの成分により形成されたノイズのレベル。一般に、インシトゥ ハイブリダイゼーションは次の主ステップからなる。(1) 試験されるべき組織または生物学的構造の固定、(2) 標的DNAの隣接性を増加し、かつ非特異的結合を減少するために生物学的構造のプレハイブリダイゼーション処理、(3) プローブの不均一混合物の生物学的構造または組織におけるDNAに対するプローブの不均一混合物のハイブリダイゼーション、(4) 特異的ハイブリッドにおける結合していないプローブを除去するポストハイブリダイゼーション洗浄 (posthybridization washes)、(5) 不均一混合物のハイブリダズされたプローブの検出。これらのステップの各々に使用された試薬および使用条件は、特定の状況により変わる。

【0172】次のコメントは、上記した一般的なステップを適用するためのガイドとして供するために意図されている。ある実験は特定の適用のために最善の染色条件を確立すべく要求される。

【0173】ハイブリダイゼーションに備えて、プローブはその形成方法にかかわらず、適宜のサイズの断片に切断してハイブリダイゼーションの最良の強度と特異性を得るようにしてもよい。断片のサイズに関する一般的なガイドラインとして、次の事項を認識することは必要なことである。断片が余りにも長い場合には、同断片は結合するための標的内に侵入し得ず、その代わりハイブリダイゼーションにバックグラウンド ノイズを与える集団を形成する。しかしながら、断片が余りにも短いと、シグナル強度が低減される。

【0174】セクションVI.B.で例示されたハイブリダイゼーションの条件のもとでは、ヒトゲノムDNAは高度コピー共有反復配列のハイブリダイゼーションをブロックする試薬として使用され、プローブ断片の好ましいサイズの範囲は約200ベース〜約2000ベース、より好ましくは約1kbである。プローブ断片のサイズが約800〜約1000ベースの範囲である場合には、好ましいハイブリダイゼーション温度は約30°C〜45°C、より好ましくは約35°C〜40°C、なお好ましくは約37°Cである。また、好ましい洗浄温度の範囲は約40°C〜50°C、より好ましくは約45°C

である。

【0175】プローブ断片のサイズは、標的物質に対するハイブリダイゼーションの以前にチェックされる。断片のサイズは、好ましくは電気泳動によりモニターされ、より好ましくは変性アガロースゲル電気泳動によりモニターされる。

【0176】固定液は酸アルコール溶液、酸アセトン溶液、ペトランクウィッチ試薬(Petrunkewitsch's reagent)、およびホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドまたはそれらの類似物等のごとき種類のアルデヒドを含む。好ましくは、約3:1の比率のエタノール-アセティック酸溶液またはメタノール-アセティック酸溶液がメタフェーズ スプレッドにおける染色体を固定するのに使用される。サスペンション中の細胞および染色体にとってはトラスク等[Trask, et al., in Science, Vol. 230, pp. 1401-1402(1985)]により記述された固定手法が使用できる。それ故、かかる文献は参考文献として取り入れられる。簡単に言えば、 K_2CO_3 とジメチルサブエリミデート(DMS) (5倍に濃縮されたストック溶液、使用前に十分に混合)が、約 5×10^6 nucleic/mlを含むサスペンションに付与される。最終の K_2CO_3 とDMS濃度はそれぞれ20mMと3mMである。25℃で15分放置後100mM サイトリックアシド/ml サスペンションの50μlを添加してpHが10.0~8.0に調整される。細胞核は遠心分離により一度洗浄される(300g, 10min., 50mM KCl, 5mM pH9.0のヘベスバッハハーおよび10mM $MgSO_4$ 中4℃にて)。

【0177】サスペンションにおける細胞または細胞核の好ましい固定手法はトラスク等により開示されており[Trask et al., Hum. Genet., 78:251-259(1988)]、同文献は参考文献として取入れられる。簡単に言えば、細胞核はPBS, 50' mM $MgSO_4$, pH7.6の1%パラホルムアルデヒド中室温で約10分間で固定され、そして二度洗浄される。細胞核は分離緩衝液(1B)中で再度懸濁される。かかる緩衝液は(50mM KCl, 5mM HEPES, 10mM $MgSO_4$, 3mM ジチオエリスリトール, 0.15mg/ml RNase, pH 8.0) / (0.05% トリトンX-100, 10% / ml)。

【0178】しばしば、インシトゥ ハイブリダイゼーションの前に、染色体は蛋白質を除去する試薬で処理される。かかる試薬は酵素または緩酸を含む。プロナーゼ、ペプシン、プロテイナーゼK等がしばしば酵素として使用される。典型的な酸処理は0.02-0.2N HClでなされ、続いて高温(例えば70℃)で洗浄される。脱タンパク質の効率、ハイブリダイゼーションを最高にするプロテイナーゼ濃度とダイジェクション時間との組合せを必要とするが、形態学的詳細(morphological detail)の許容し得ないロスの原因とはならない。最適の条件は組織型および固定方法により異なる。プロテイナーゼ処理後の付加的固定は有用である。従って、特定の適用のためには、ある実験がプロテイナーゼ処理を効率的にするために

要求される。

【0179】あるケースでは、標的物質から残余のRNAを除去するためにRNaseによる前処理が望ましい。かかる除去処理は、50-100μg/ml (RNase in 2×SSC)中で室温で1-2時間、固定された染色体のインキュベーションにより遂行できる。(但し、SSCは0.15M NaClと0.015M ソジウム サトトレイトの溶液である)。

【0180】不均一プローブ混合物のプローブを染色体DNAにハイブリダイズするステップは、以下のステップを含んでいる。(1)プローブが相補的重鎖領域への接近を促進できるように標的DNAを変性すること、および(2)プローブを標的物質における相補的座位にアニール(anneal)することを可能にする条件のもとで不均一混合物を適用すること。変性方法は高pH、低pH、高温、またはホルムアミド、テトラアルキルアンモニウム ハライドのごとき有機溶剤、またはそれらの類似物の存在のもと、濃度および温度の種類の組合せでのインキュベーションを含む。標的物質中の一重鎖DNAはエキソヌクレアーゼIII [van Dekken et al., Chromosoma (Berl) 97:1-5 (1988)]のごとき酵素で形成できる。好ましい変性手法は約35-95% in 2×SSCの濃度、約25-70℃の温度でのホルムアミドにおける1-10分のインキュベーションである。これらの範囲内での効率的なインキュベーション時間、濃度、および温度の決定は、固定方法およびプローブ核酸(例えばDNAまたはRNA)の型を含む種々の変動要因に依存する。

【0181】染色体DNAが変性された後、変性要因は典型的には不均一プローブ混合物の適用以前に除去される。ここでホルムアミドと熱は主要な変性要因であり、それらの除去は溶剤による幾度かの洗浄により都合良く遂行される。かかる溶剤は例えば70%, 85%, 100%冷エタノール シリーズのごとき、しばしば冷却される。変性物質の組成は他の構成物の付加または適宜の溶剤での洗浄のいずれかにより、インシトゥ ハイブリダイゼーションのために適宜に調整できる。プローブおよび標的核酸はハイブリダイゼーション混合物の適用、およびその後の適宜の加熱により同時に変性される。

【0182】不均一混合物が適用される時間の間の、染色体DNAおよびプローブの雰囲気の物理化学的条件はハイブリダイゼーション条件、またはアニール条件に関係する。特定の適用における最上の条件は、幾多のファクターをコントロールすることにより調整でき、同ファクターとしては以下のものが含まれる。成分の濃度、不均一混合物中の染色体のインキュベーション時間、不均一混合物を構成する核酸断片の濃度、コンプレキシティ、および長さ。概略的には、ハイブリダイゼーション条件は、非特異的結合を最小限にするために溶融温度に十分に近づけなければならない。他方、かかる条件は、相補的配列の正確なハイブリダイゼーションを検出レベル以下に低減し、または長いインキュベーション時間を

過剰に要求すること程には厳格なものではない。

【0183】ハイブリダイゼーション混合物中の核酸の濃度は重要な要因である。かかる濃度は十分に高くなければならず、これによりそれぞれの染色体結合座位の十分なハイブリダイゼーションが適当な時間内(数時間～数日)に生じる。十分なシグナルを得るのに要する濃度より高い濃度は避けるべきであり、これにより非特異的結合が最小となる。不均一混合物のプロープにおける核酸の濃度に関する、重要な実際の拘束は溶解度である。断片濃度、例えば単位体積当りの核酸の単位長さに関しては上限が存在し、それは溶液中で保持できかつ効果的にハイブリダイズする。

【0184】後述のセクションVI.B.で記述された典型的な実施例において、ハイブリダイゼーション混合物におけるDNA濃度は $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のオーダーの上限を持っている。かかる全染色体染色のためには、 $1\text{--}20\text{ng}/\mu\text{l}$ のプロープ濃度を使用された。ゲノムブロッキングDNAの量は、Qが5未満であるように調整された。プロープ濃度の下限において、1時間のインキュベーションで十分なシグナルが得られた。すなわち、プロープおよびブロッキングDNAは標的物質に適用する以前にいっしょに保持され、高度コピー配列をブロックし、16時間のハイブリダイゼーションに付される。シグナルはハイブリダイゼーションの2時間後可視化された。最良の結果(最高コントラストの光輝シグナル)は、100時間ハイブリダイゼーション後に生じた。かかるハイブリダイゼーションは、低度コピー標的配列に結合座位を発見するためのより多くの機会を与えた。プロープ濃度の上限において、光輝シグナルは16時間またはそれ未満の時間のハイブリダイゼーション後に得られた。コントラストは、より多くの標識された反復配列がプロープ中に含まれている故に減少した。

【0185】固定された標的物質はプロープDNAの非特異的結合を減らすために、ハイブリダイゼーションステップの間またはその後に幾多の手段で処理される。これらの処理は下記の処理を含む。非プロープ、"キャリア"、DNAを不均一混合物に添加すること、デンハルト溶液(Denhardt's solution) (Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 23, pp. 641-645 (1966))のごときコーティング溶液を不均一混合物とともに使用すること、数分～数10分例えば5-20分、変性溶剤中ハイブリダイゼーション温度より上5-10°Cの温度でインキュベートすること、RNAプロープのケースでは一重鎖RNase in $2\times\text{SSC}$ (例えば5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase) による室温での1時間の緩処理。

【0186】V. 選択された単一コピーの配列からなる染色体染色試薬

V.A. ヒト第21染色体に特異的な染色試薬の製造および使用

V.A.1. 第21染色体の分離および第21染色体-特異的ライブラリーの構造

ヒト染色体-特異的ライブラリーからのDNA断片は、ナショナル ラボラトリー-ジーン ライブラリー プロジェクト(National Laboratory Gene Library Project)からアメリカン タイプ カルチャー コレクション [American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD.] を通して入手可能である。第21染色体からのDNA断片は、フスコー等により記載された手法 [Fusco et al., in "Construction of Fifteen Human Chromosome-Specific DNA Libraries from Flow-Purified Chromosome", Cytogenet. Cell Genet., Vol. 43, pp. 76-86 (1986)] で造られ、この文献は参考文献として取り入れられる。簡単に言えば、ヒト二倍体繊維芽細胞培養は新生児包皮組織から確立された。細胞の染色体はファン デン エンフ等の MgSO_4 法 [van den Engh et al., Cytometry, Vol. 5, pp. 108-123 (1984)] により分離され、蛍光染料-ヘキスト33258およびクロモマイシンA3-で染色された。第21染色体はピータース等 [Peters et al., Cytometry, Vol. 6, pp. 290-301 (1985)] により述べられたローレンス リバーモア ナショナル ラボラトリーの高速ソーターにより分離された。

【0187】ソーティングの後、染色体濃度は約 $4\times 10^6/\text{ml}$ であった。それゆえ、DNAの抽出に先立って、染色体($0.2\text{--}1.0\times 10^6$)は4°Cで30分間、 $40,000\times\text{g}$ で遠心により濃縮された。それからベレットは0.5%のSDSと100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテイナーゼKを含む100 μl のDNA分離緩衝液(15mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM トリスHCl pH8.0)中に再浮遊された。37°Cで一晩のインキュベーションの後に、タンパク質はフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)で二度、そしてクロロホルム:イソアミルアルコール(24:1)で一度、抽出された。DNAの量が少量であるので、各有機相は少量の10mM トリスpH8.0, 1mM EDTA (TE)で再抽出された。水相層はシュライヒャーとシュエルのミニコロジオン膜(Schleicher and Schuell mini-collodion membrane) (HUH20/25)に結合されて移され、6-8時間室温でTEに対し透析された。それから精製されたDNA溶液は、50mM NaCl, 10mM トリスHCl pH7.5, 10mM MgCl_2 , 1mM ジチオトレイトール中で50ユニットのHind III (Bethesda Research Laboratories, Inc.) でもってダイジェストされた。37°Cで4時間後、反応は上述のごとくフェノールおよびクロロホルムを用いた抽出により停止された。水相はミニコロジオンバッグ中で一晩4°Cで水に対し透析され、それからHind III でクリーブ(cleave)されウシ-アルカリホスファターゼ(calf alkaline phosphatase) (Boehringer Mannheim)で処理された2 μg のカロン21Aアームズ(Charon 21A arms)が加えられた。溶液は真空の下で50-100 μl の容積まで濃縮され、0.5mlのマイクロフュージチューブ(microfuge tube)に移されて、そこでDNAは10分の1容積の3M ソジウムアセテートpH 5.0および2容積のエタノールと共に沈降された。沈降物は遠心により集められ、冷たい70%エタノールで洗浄さ

れ、10 μ lのTEに溶解された。

【0188】DNAが数時間溶解するのを許容した後、1 μ lの10 \times リガーゼ緩衝液(0.5MトリスHCl pH7.4, 0.1M MgCl₂, 0.1Mジチオトレイトール, 10mM ATP, 1mg/mlウシ血清アルブミン)および1ユニットのT4リガーゼ(Bethesda Research Laboratory, Inc.)が加えられた。連結反応は10 $^{\circ}$ Cで16-20時間インキュベートされ、3 μ lのアリコート(aliquotes)がホーンにより記載[Horh in Methods in Enzymology, Vol. 68, pp. 299-309 (1979) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982)]されたE. coli細胞株BHB2688およびBHB2690から調製されたインビトロ抽出物を用いてファージバッチクルに組み込まれた。簡単に言えば、両抽出物は音波処理により調製されてインビトロパッケージング(in vivo packaging)のときに組み合わされた。これらの抽出物は野生型ラムダDNAを、マイクログラムあたり1-5 $\times 10^8$ プラークフォーミングユニット(pfu)の効率でパッケージした。結果として生じたファージは、プラークと一緒に成長するのを阻止した異なる組換え物の成長率の差を最小にするために、約10⁴ pfu/150mmディッシュの密度で8時間、E. coli LE392上で増幅された。ファージはプレートごとに10mlのSM緩衝液(50mMトリスHCl pH7.5, 10mM MgSO₄, 100mM NaCl, 0.01%ゼラチン)中で、4 $^{\circ}$ Cで12時間穏やかに揺動かすことにより溶離された。それからプレートは余分の4mlのSMでリンスされた。細胞の破片をベレット化した後、ファージ浮遊液はクロロホルムによって4 $^{\circ}$ Cで貯えられた。

【0189】V.A.2. ヒトリンパ細胞の第21染色体を染色するための第21染色体-特異的染色剤の構造および使用

非反復配列インサートを有するクローンはベントンおよびデイビスの方法[Benton and Davis, Science, Vol. 196, pp. 180-182 (1977)]により分離される。簡単に言えば、約1000の組換えファージが第21染色体-特異的ライブラリーからランダムに分離される。これらはニトロセルロースに移されてニックトランスレートされた全ゲノムヒトDNAでプローブされる。

【0190】強いハイブリダイゼーションを示さないクローンのうち、明白な非反復配列DNAを含むおよそ300が抽出される。選択されたクローンが増幅された後、各クローン中の第21染色体インサートは³²P標識されて、第21染色体ライブラリーを構成するのに使われたと同じ酵素すなわちHind IIIでダイジェストされたヒトゲノムDNAのサザンブロット(Southern blots)にハイブリダイズされる。クローンを含む非反復配列はサザン分析の間に単一のバンドを生じるものとして認識される。およそ100のこのようなクローンが不均一な混合物に対して選択される。非反復配列クローンは増幅され、インサートはHind IIIダイジェクションにより除去されて、インサートはゲル電気泳動によりファージアームから分離され

る。プローブDNA断片(すなわち非反復配列インサート)はゲルから除去されてニックトランスレーションにより(例えば Bethesda Research Laboratories から入手可能なキットにより)ビオチン化される。標識されたDNA断片は、pH7.5の50mMトリス, 1mM EDTA, 0.1% SDS中で膨潤されたセファデックスG-50(媒体)で充填した0.5ml エッペンドルフチューブ(Eppendorf tubes)中に造られた小型のスピンカラム(spin columns)を用いて、ニックトランスレーション反応から分離される。ヒトリンパ細胞染色体はハーバー等[Harper et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci., Vol. 78, pp. 4458-4460 (1981)]に従って調製される。中期および前期の細胞は磷酸緩衝液中で3回洗浄され、メタノール-アセティックアシッド(3:1)中で固定され、清潔にされた顕微鏡スライド上に落された。スライドは-20 $^{\circ}$ Cで窒素雰囲気中に貯えられる。

【0191】前期の細胞および/または中期のスプレッドを載せたスライドは窒素から取り出され、4時間かけて空気中で65 $^{\circ}$ Cまで加熱され、RNアーゼで処理(100 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ Cで1時間)されて、エタノールシリーズ中で脱水される。それからプロテイナーゼKで処理(60ng/ml, 37 $^{\circ}$ Cで7.5時間)されて脱水される。プロテイナーゼKの濃度は、細胞の型と酵素のロットに基づいて、染色体の位相顕微鏡による像が乾燥したスライド上に殆ど残らないように調整される。ハイブリダイゼーション混合物は(最終濃度で)、50%のホルムアミド, 2 \times SSC, 10%のデキストランサルフェート, 500 μ g/mlのキャリヤDNA(音波処理されたニンジン精子DNA)および2.0 μ g/mlのビオチン標識された第21染色体-特異的DNAからなっている。この混合物はガラスのカバースリップの下に3 μ l/cm²の密度でスライドに適用されてラバーセメントでシールされる。37 $^{\circ}$ Cで一晩のインキュベーションの後、スライドは45 $^{\circ}$ Cで洗浄(50%ホルムアミド-2 \times SSC pH7, 3回3分、続いて2 \times SSC pH7, 5回2分)されて、BN緩衝液(0.1Mソジウムビカーボネート, 0.05%NP-40, pH8)に浸される。この時点以後、スライドは決して乾燥させてはならない。

【0192】スライドはBN緩衝液から取り出されて、室温で5分間、5%の脱脂粉乳(Carnation)および0.02%のソジウムアジド(プラスチック製カバースリップの下で5 μ l/cm²)でブロックされる。カバースリップは取り除かれ、余分の液体は手早く排出されて、フルオレセイン-アビジンDCS(5%の粉乳と0.02%のソジウムアジドを有するBN緩衝液中で3 μ g/ml)が加えられる(5 μ l/cm²)。同カバースリップは戻されてスライドは37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートされる。それからスライドは3回2分間、それぞれ45 $^{\circ}$ CのBN緩衝液中で洗浄される。ビオチン-連結されたフルオレセインの強さは、ビオチン化されたヤギ抗-アビジン抗体(5%のヤギ血清と0.02%のソジウムアジドを有するBN緩衝液中で5 μ g/ml)の層を加え、続いて上記と同様に洗浄した後、フルオレセイン-アビジンDCSの別の層を加えることにより増幅される。フルオレセイン-

アビジンDCS、ヤギ抗アビジンおよびヤギ血清は全て商業的に入手可能〔例えばVector Laboratories (Burlingame, CA)〕である。BN中での洗浄後、蛍光抗フェード液、p-フェニレンジアミン(カバースリップに関し $1.5\mu\text{l}/\text{cm}^2$)が観察の前に加えられる。最適の顕微鏡像を得るにはこの層を薄く保持することが重要である。この抗フェード液はフルオレセインの減退を大幅に減少させて5分間までの連続した顕微鏡観察を可能にする。この抗フェード液には、DNA対比染色剤(DAPIまたはプロビジウム-アイオダイド)が $0.25\text{--}0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ で含まれている。

【0193】赤い蛍光を発するDNA-特異的染料プロビジウムアイオダイド(PI)は、ハイブリダイズされたプロローブと全DNAを同時に観察することを可能にするために使用される。フルオレセインおよびPIは $450\text{--}490\text{nm}$ (Zeiss filter combination 487709)で励起される。励起波長を 546nm (Zeiss filter combination 487715)に増大すればPIのみの観察を可能にする。DAPI、紫外線 (Zeiss filter combination 487701)で励起される青い蛍光のDNA-特異的染色剤は、ビオチン-標識されたものと全DNAが別々に観測される場合に対比染色剤として使用される。中期第21染色体は染色体の本体上に散らばるランダムに位置する黄色いスポットにより検出される。

【0194】V.B. 第21染色体シングルコピー配列を効率よく選択する改良された方法

フスコー等 [Fuscoe et al., Genomics, 5:100-109 (1989)] は、多数のシングルコピー配列または非常に低いコピー数の反復配列クローンを組換えファージライブラリーから選択するための、すぐ上(V.A.2)で述べた方法よりもっと効率的な手法を提供して、第21染色体を染色するためのその使用につき実証している。前記記事はこれにより参考として取り入れられる。簡単に言えば、クローンは2つの基本的手法を用いて(ヒト第21染色体のDNAから造られた)カロン21Aから選択された。第1に、ファージライブラリーは、クローン内の反復配列の存在に対しセクションV.A.2の方法よりもっと敏感になるように案出された方法を用いて2つのステージに区別された。それから選択されたクローンはプラスミドにサブクローンされた。このようにして選択された450のインサートがライブラリーpBS-U21を形成する。第2は複数ステップの処理からなり、そこでは1) LL21NS02からのインサートはブルースクライブプラスミドにサブクローンされ、2) プラスミドはニトロセルロースのフィルター上のバクテリアコロニー中で高密度で増殖され、3) 放射性ヒトゲノムDNAがニトロセルロースのフィルター上のプラスミドDNAに2ステップの低い厳格性でハイブリダイズされ、4) ハイブリダイズされなかったインサートを有するプラスミドがシングルコピー配列を備えている可能性があるものとして選択された。このようにして5030のコロニーが選出されて、ライブラリーpBS-U21/1530を形成した。

【0195】サザン分析は、反復配列を見分けるのに第2の手法の方が第1のよりも効率的であることを示した。pBS-U21/1530からのDNAでの蛍光インシトゥハイブリダイゼーションは、ヒトリンパ細胞から造られた中期スプレッド中の第21染色体の特異的で強い染色を可能にした。pBS-U21でのハイブリダイゼーションは第21染色体につきより少ない特異的染色を与える。フスコー等の組換えライブラリーからシングルコピー配列または非常に低い反復配列を選択する方法に関する詳細は、フスコー等 [Fuscoe et al., id] に記載されている。

【0196】V.C. 第4染色体シングルコピー配列のコレクションとのハイブリダイゼーション
ピンケル等 [Pinkel et al., PNAS (USA), 85:9138-9142 (December 1988)] は、第4染色体シングルコピー配列を調製する手法および、次いで前記シングルコピーアプローブをヒト中期スプレッドにハイブリダイズするためのプロトコル(ピンケル等 [Pinkel et al.; PNAS (USA), 83:2934-2938 (1986)] に記載された手法の変形を記載している。図4Hは第4染色体からの120のシングルコピーアプローブのプールでのヒト中期スプレッドに対するハイブリダイゼーションを示す。

【0197】VI. 共有反復配列の無能力化

VI.A. ブロッッキングDNAを使用した第21染色体-特異的染色

高濃度の標識されていないヒトゲノムDNAとラムダファージDNAが標的染色体に対し反復およびベクターDNA配列結合を抑制するのに使用された。重質プロテイナーゼのダイジェーションとこれに続く標的の固定は標的DNAに対するアプローブのアクセスを改良する。

【0198】ヒト中期スプレッドは標準的手法でもって顕微鏡スライド上に調製されて -20°C で窒素雰囲気中に貯えられた。

【0199】スライドはフリーザーから取り出されて染色手法を始める前に窒素雰囲気中で室温まで温まるようにされた。暖められたスライドはまずP緩衝液(20mM トリス, 2mM CaCl_2 pH7.5)中で $0.6\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテイナーゼKで処理されてP緩衝液中で一度洗浄された。使用されたプロテイナーゼKの量はスライドの異なるバッチ毎に調整する必要がある。変性後スライドは $2\times\text{SSC}$ 中に貯えられた。50%のホルムアミド、10%のデキストランサルフェート、1%のトウィーン20、 $2\times\text{SSC}$ 、 $0.5\text{mg}/\text{ml}$ のヒトゲノムDNA、 $0.03\text{mg}/\text{ml}$ のラムダDNA、および $3\mu\text{g}/\text{ml}$ のビオチン標識されたアプローブDNAからなるハイブリダイゼーション混合物が調製された。アプローブDNAはセシウムクロライドグラディエント(cesium chloride gradient)により決定された、第21染色体Hind IIIフラグメントライブラリー(ATCC登録番号57713)からのファージの最高密度のフラクションから成っていた。(アプローブのインサートおよびファージDNAは何れもニックトランスレーションにより標識された。)ゲル電気泳動により決定された

平均的インサートのサイズ(第21染色体DNAの量)は約5キロベースであった。反復配列をインサートから除いたりインサートをラムダファージベクターから分離する試みはなされなかった。ハイブリダイゼーション混合物は70℃で5分間加熱し続いて37℃で1時間インキュベーションすることにより変性された。インキュベーションはハイブリダイゼーション混合物内のヒトゲノムDNAと標識されていないラムダDNAが、プローブ内のヒト反復配列およびベクター配列をブロックするのを可能にする。

【0200】ヒト中期スプレッドを含むスライドは2×5SCから取り出されてレンズペーパーで拭いて乾かされた。ハイブリダイゼーション混合物は直ちにスライドに適用され、ガラスのカバースリップがラバーセメント共にスライド上に置かれて、スライドは37℃で一晩インキュベートされた。その後スライドの調製はセクションV.B.で述べた手法で進められた(ここでは第21染色体DNAはフルオレセインで染色されて全染色体DNAはDAPIで対比染色された)。図1A-Cはその結果を示す。図1Aはコンピュータ画像分析装置で得られたヒト中期スプレッドのDAPI像である。これは全てのものをしきい値以上は白でそれ以外は黒で示すバイナリーイメージである。基本的データは256の強度レベルの灰色レベル像で記録された。(小さい矢印は第21染色体の位置を示す。)図1Bは図1Aと同じスプレッドの、これもバイナリー形式での、フルオレセイン像である。(ここでも小さい矢印は第21染色体の位置を示す。)図1Cは、他のより淡く染色されたものが標準的イメージ処理技法で除かれた後の第21染色体の位置を示す。

【0201】VI.B. 第21トリソミーの検出およびブルースクライププラスミドライブラリーを使用した第4染色体の転座
セクションVI.A.で説明したごとく、共有反復配列を含むヒト染色体-特異的ライブラリーは、標識しないヒトゲノムDNAでのインキュベーションにより共有反復配列のハイブリダイゼーションキャパシティが減少されていれば、その染色体を染色するのに使用することが出来る。セクションVI.A.では、不均一な混合物の核酸配列がファージベクターカロン21A中でクローンされ、そこではベクターDNAのインサートの比は約0.1(40kbのベクターに対し平均4kbのインサート)である。このセクションでは、より小さいクローニングベクター、約3キロベースのブルースクライププラスミド、に対して同じインサートの転移することが、ベクターDNAに対するインサートの比を0.5に増大させて、染色の特異性と強さを改良したことを実証する。

【0202】前に論議したごとく、プローブのインキュベーションはプローブ単独でも、標識されていないゲノムDNAと混合されたプローブでも、また全体で濃縮された標識されていないDNAまたはある共有反復配列と混合されたプローブでも行えることを論議した。もし

標識されていないゲノムDNAが加えられるならば、プローブ内の共有反復配列を十分に無能力化するに足るだけ加えることが重要である。しかしながら、ゲノムDNAはハイブリダイゼーションが要望される配列の標識されていないコピーも含んでいる。上に述べたごとく、ここではハイブリダイゼーション混合物中の染色体-特異的配列の標識されたコピーに対する標識されていないものの比としてQが定義される。

【0203】ピンケル等[Pinkel et al., PNAS(USA), 85:9318-9142(December 1988)]は、他の染色体と共有している染色体-特異的ライブラリー中の配列のハイブリダイゼーションを競争して阻止するための標識されていないゲノムDNAの使用を記載している。この論文はヒト染色体-特異的ライブラリー[ブルースクライププラスミド(pBS-4)]にサブクローンされた第4染色体ライブラリー-LL04NS02;ブルースクライププラスミド(pBS-21)]にサブクローンされた第21染色体ライブラリー-LL21NS02]での蛍光インシットゥハイブリダイゼーションのための原料および方法を記載している。これらのハイブリダイゼーションの結果は図4A-Cおよび図4FおよびGに示されている。

【0204】VI.C. ヒト中期スプレッドに対する酵母人工染色体(YACS)のハイブリダイゼーション
YACS: 7つの酵母クローンHY1, HY19, HY29, HYA1.A2, HYA3.A2, HYA3.A9およびHYA9.B6がD.パーク(Washington University, St. Louis, MO)から得られた。クローン中のヒトDNAの長さは約100kbから600kbの範囲であった。ゲル電気泳動がこれらのインサートのサイズを確かめるために行われた。これらの各クローンは増殖されて全てのDNAが分離された。分離されたDNAはチミジンの10-30%がビオチン-11-dUTPで置換されるようにニックトランスレーションによりビオチン化された。ニックトランスレーション後の全ての標識されたDNAの濃度は10-20ng/ μ lの範囲内だった。

【0205】ブロッキングDNA: ヒト胎盤DNA(Sigma)がプロテイナーゼKで処理され、フェノールで抽出されて、200-600bpのサイズ範囲にまで音波処理された。人工染色体を含まない酵母から分離された全DNAが同様のサイズ範囲まで音波処理された。これらのDNAは両方とも1-10 μ g/ μ lの濃度に保持された。

【0206】蛍光インシットゥハイブリダイゼーション(FISH): ハイブリダイゼーションは僅かの変更を加えて上記ピンケル等(1988)に従って行われた。中期スプレッドは、ハーバー等の手法[Harper et al., PNAS(USA)78:4458-4460, (1981)]によるメトトレキセート同期培養により調製された。細胞はメタノール/アセティックアシッド(3:1)中で固定され、スライド上に落とされ、空気乾燥されて、使用されるまで-20℃で窒素中に貯えられた。それからスライドは標的DNA配列を変性するために70%ホルムアミド/2×SSC中に2分間浸され、70-85-100%

エタノール系中で脱水され、空気乾燥された。(SSCは0.15M NaCl/0.015M Na Citrate, pH7である。)それから10-100ngのビオチン化された酵母DNA、およびそれぞれ約1 μ gの標識されていない酵母とヒトゲノムDNAがハイブリダイゼーション混合物(最終容積10 μ l、最終組成50%ホルムアミド/2×SSC/10%デキストランサルフェート)に加えられ、70℃で5分間加熱され、それから更に高度に反復された配列の相補的ストランドが再結合するのを許容するために70℃で1時間加熱される。

【0207】次いでハイブリダイゼーション混合物はスライド(面積およそ4cm²)に適用されてガラスのカバースリップのもとにラバーセメントでシールされた。37℃で一晩のインキュベーションの後に、カバースリップは除かれてスライドは3回3分それぞれ42-45℃の50%ホルムアミド/2×SSC中で、また1回PN緩衝液[pH8の0.1M NaH₂PO₄と0.1M Na₂HPO₄の混合物;0.1%Nonidet P-40(Sigma)]中で洗浄された。それから結合されたプローブは、アビジン-FITCおよびヤギ-抗-アビジン抗体(何れもPNM緩衝液(PN緩衝液プラス5%脱脂粉乳、固形分除去のため遠心分離;0.02%ソジウムアジド)中に5 μ g/ml)中で交

互の20分のインキュベーション(室温)で検出された。アビジンおよび抗-アビジンインキュベーションはそれぞれPN緩衝液中での3回3分の洗浄で分離された。2または3層のアビジンが加えられた(アビジン、DCSグレードおよびビオチン化されたヤギ-抗-アビジンはVector Laboratories Inc., Burlingame, CAから得られる)。

【0208】第5図はHYA3.A2(580kbのヒトDNA)の12q21.1に対するハイブリダイゼーションを示している。ハイブリダイゼーションの位置は、DAPI/アクチノマイシンD法[Schweizer, "Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI", Chromosoma, 58: 307-324(1976)](DAPI/actinomycin D procedure)を採用した通常の蛍光バンドニング手法を用いて確定された。ハイブリダイゼーション信号は各第21染色体の幅を横切るバンドを形成し、染色体のその領域におけるDNAの充填の形態構造を示している。

【0209】YACクロンの位置は下記第2表に示すとおりと考えられる。

【0210】

【表2】

YAC 競 合 ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン

(YAC Competition Hybridization)

YAC ク ロ ー ン	イ ン サ ー ト サ イ ズ	部 位
HY1	120	Xq23
HY19	450	8q23.3
		21q21.1
HY29	500	14q12
HYA1.A2	250	6q16
HYA3.A2	580	12q21.1
HYA3.A9	600	14q21
HYA9.H6	280	1p36.2
		3q22

【0211】VI.D. ヒト/ハムスター雑種細胞とのハイブリダイゼーション。
上記ペンケル等(1988)の手法で詳述され上記セクションV.C.およびVI.B.で例示されたと本質的に同じハイブリダイゼーションおよび染色条件が、この例では使用された。この例では、ヒト第19染色体の一つのコピーを含むハムスター-ヒト雑種細胞からの400ngのビオチン標識さ

れたDNAが、10ulのハイブリダイゼーション混合物中で、1.9 μ gの標識されていないヒトゲノムDNAと混合された。ハイブリダイゼーションは37℃でおよそ60時間であった。結合プローブの蛍光染色と染色体の対比染色は上述の他の例と同様であった。図6は、ハイブリダイゼーションの結果を示す。

【0212】VII. 具体的適用例

この発明は、細胞上において細胞ベースで、顕微鏡的なまたある場合にはフローサイトメトリ的な遺伝的異常の検出を可能にする。検鏡は全て人間の観察者によりなされてもよいし、完全なオートメーションにいたるまでの種々の程度の付加的器具の使用および算出方法の助成手段を含んでもよい。このような分析のための器具の使用やオートメーションは多くの利点を与える。その中には、人間の観察者には不可視な蛍光染料（例えばインフュアードダイ(infrared dyes)）の使用や、同時的には可視でない多重標識法（例えば蛍光および吸収染色、オートラジオグラフィ等）の組合せで得られた結果を判断する機会がある。量的測定は人間の観察者では検出できない染色の差を検出するのに使用できる。以下に述べるごとく、オートメーション化された分析は、細胞および染色体が分析される速度を増大させることもできる。

【0213】本発明のプロープで検出できる細胞遺伝学的異常のタイプはつぎのものを含む。重複；染色体タイプの全体または部分の重複が、その染色体タイプまたは部位のためのプロープでのハイブリダイゼーションに続く中期スプレッドまたは間期核中の識別できるハイブリダイゼーションドメインの数またはサイズの増加として、または結合されたプロープの量の増加により検出できる。もしプロープが蛍光により検出されるならば、結合されたプロープの量はフローサイトメトリ的にまたは定量的蛍光検鏡により確定される。欠失；全染色体または染色体部位の欠失が、その染色体タイプまたは部位のためのプロープでのハイブリダイゼーションに続く中期スプレッドまたは間期核中の識別できるハイブリダイゼーションドメインの数またはサイズの減少として、または結合されたプロープの量の減少により検出できる。もしプロープが蛍光により検出されるならば、結合された量はフローサイトメトリ的にまたは定量的蛍光検鏡により確定される。転座、二動原体および逆位；転座、二動原体および逆位が、普通は再配列の点にある染色体の領域の側部に位置しまたは伸びるプロープでのハイブリダイゼーションに続いて分離されるハイブリダイゼーションドメインの異常な並置により中期スプレッドおよび間期核中において検出される。転座は少なくとも2つの異なる染色体タイプに影響を与えて、ただ一つの動原体をそれぞれ有する派生的染色体という結果となる。二動原体は少なくとも2つの異なる染色体タイプに影響を与えて、動原体を欠く少なくとも一つの染色体断片と2つの動原体を有するもう一つという結果となる。逆位は染色体の一部の極性の逆転を伴う。

【0214】VII.A. バンド分析

中期スプレッドによる自動的な染色体の分類および異常検出のためのオートメーション化されたシステム（特にコンピューター制御顕微鏡）の開発に向けて、過去30年間相当な努力がなされてきた。近年は、種々の染色体タイプ上にはっきり認識できるバンディングパターンを生

ずるようにより化学的に染色された染色体の自動分類に努力が向けられてきた。これらの努力は、おおよそ同じサイズの染色体タイプ間のバンディングパターンの微妙な差のために、また異なる中期中の染色体の特質的な収縮は各タイプの染色体上に見られるバンドの数および幅の変化の原因となるので、ごく部分的にしか成功していない。本発明は、間隔、幅および標識の差異（例えば異なる色）がオートメーション化された染色体の分類および異常検出を容易にするように最適化される染色パターンを生じる試薬の構成を可能にすることにより、これらの問題を克服する。このことは、ハイブリダイゼーションプロープが染色体の長さに沿って所望のように選択できるので可能である。このような試薬により生じるバンドのサイズは、単一の小さいドットから一つまたはそれ以上の染色体を本質的に一様に覆うものまでの範囲に及ぶであろう。従って本発明は、隣接したハイブリダイゼーションドメインが例えば色により見分けられるような、ハイブリダイゼーションプロープの構成、および好ましくは蛍光のような標識手段の使用を可能にし、これにより分解するには空間的に余りにも接近しているバンドもスペクトル的に検出される（すなわち、もし赤と緑の蛍光を発するバンドが合体していれば、この2つのバンドの存在は結果として生じる黄色の蛍光により検出される）。

【0215】本発明はまたバンディングパターンの構成を具体的な適用例に適応させるのを可能にする。従ってそれらは、例えば全体の形状およびサイズが同様であり従来の技法を用いたのでは同様のバンディングパターンを有する染色体上において、空間的配置および色の混合がきわめて異なるものになり得る。本発明のプロープにより生じるハイブリダイゼーションバンドのサイズ、形および標識（例えば色）は、機械評価(machine scoring)の誤りを除くように最適化でき、正確なオートメーション化された異常検出が可能になる。この最適化されたバンディングパターンはまた視覚による染色体分類および異常検出を大幅に改良する。

【0216】特異的転座切断点の認識の容易さは、切断の領域に対しびつたりと標的化された試薬の使用により改良される。例えば、染色体の切断の両側にハイブリダイズする配列からなる本発明による高コンプレキシティプロープが使用できる。切断の一侧に結合されるプロープの部分は他側に結合されるものとは、例えば異なる色により異なって検出される。このようなパターンでは、正常な染色体は互いに隣あった異なる色のハイブリダイゼーション領域を有するであろうし、このようなバンドは接近して現れるであろう。切断はプロープを異なる染色体に分離するか結果的に染色体断片となるであろうし、平均して更に離れて視覚化されるであろう。

【0217】VII.B. 生物学的線量法

生物学的線量法への一つの接近手段は、潜在的に有毒な

薬剤に暴露された個体により被った遺伝学的損傷の兆候として、構造的に異常な染色体の頻度を測定することである。多数の研究が、染色体異常誘発物と呼ばれる電離性放射線およびその他の薬剤に対する暴露の増大と共に構造的異常の頻度が増大することを示している。二動原体染色体は、その特徴のある性質がバンド分析なしに速やかに記録することを可能とするので、最も普通に記録される。作業場で見いだされるレベルに暴露された個体におけるこのような異常は低い頻度 ($\sim 2 \times 10^{-3}$ /細胞) であるので、速やかな分析が重要である。遺憾ながら、二動原体は安定して維持されないので測定された二動原体の頻度は暴露後の時間と共に減少する。従って、長時間にわたる低レベルの暴露は、異常が連続的に除去されるので結果的に高い二動原体頻度とはならない。転座は多かれ少なかれいつまでも維持されるのでこのような線量法的研究のための記録にはより適した異常である。従って、遺伝子損傷の評価を暴露後長時間たったときに行うことが出来る。転座は、それを見分けることの困難さが線量法のために充分な数の細胞を記録することを論理的に不可能にするので、生物学的線量法のためには日常的に記録されない。

【0218】本発明はこの困難さを除くものである。特にいくつかの染色体 (例えば第1, 第2, 第3および第4染色体) を本質的に一様に染色するプローブでのハイブリダイゼーションは、これらの染色体を巻き込んだ構造的異常の中期スプレッド中における即時の顕微鏡的同定を可能にする。正常な染色体はプローブにより完全に染色されまたは染色されないで現れる。標的および非標的染色体の間の転座の結果派生した染色体は、部分的にのみ染色されたものとして認識される (図4D)。このような部分的にハイブリダイズされた染色体は、顕微鏡内で視覚的にまたはコンピューターにより助成された検鏡を採用したオートメーション化されたやり方で即時的に認識される。転座と二動原体の間の識別は、プローブに全ての染色体動原体で見出される配列を加えることにより容易になる。プローブエレメントの残りを検出するのに使用されたものとは異なる、標識手段例えば色を有するプローブの動原体の成分の検出は染色体動原体の即座の識別を可能にし、それは次いで二動原体と転座の間の識別を容易にする。この技術はこれまでの技法では必要であった記録のための努力を劇的に減少させて、低レベルの生物学的線量法のために必要な一万もの中期スプレッドを検査することを可能にする。

【0219】VII.C. 出生前診断
出生前に発見される最も普通の異常は、第21染色体 (ダウン症候群)、第18染色体 (エドワード症候群) および第13染色体 (パトー症候群) ならびにXO染色体 (ターナー症候群)、XXY染色体 (クラインフェルター症候群) およびXYY染色体の異常を伴う三染色体性である。構造的異常も生じる。しかしながら、これらはまれであって

その臨床的重要性もしばしば不確実である。従って、これらの異常を検出することの重要性は疑問である。羊水穿刺や絨毛生検の様な伝統的な核型のために胎児細胞を得る今の技法は、分析のための百から千の細胞をもたらす。これらは通常細胞遺伝学的分析に充分な分裂細胞を作り出すために、2から5週間培養基中で増殖される。中期スプレッドが調製されれば、伝統的バンド分析で分析される。このような処理は高度に熟練した分析家によってのみ実行できた時間を浪費するので、最大の細胞遺伝学研究所によるものでも信頼性を持ってなされる分析の数は年に数千だけである。結果的に、出生前の細胞遺伝学的分析は通常、子供に遺伝病の高いリスクがある婦人 (例えば35才以上の婦人) に限られている。

【0220】本発明は、細胞培養不要または最小限の細胞培養で、間期細胞中の普通の数字で表した細胞異常の簡単な速やかな同定を可能にしてこれらの困難さを克服するものである。特に、第21, 第18, 第13, XおよびY染色体の異常の数が、これらの染色体 (またはそのダウン症候群に対する21q22のごとき重要な領域) に対し特異的なプローブでのハイブリダイゼーションに続いて、ハイブリダイゼーションドメインの数を計数することにより間期細胞において検出できる。ハイブリダイゼーションドメインはハイブリダイゼーションの強さが高くなっている密ではっきりした領域である。第21, 第18および第13染色体に対する3つのドメインを示す細胞の増大した頻度 (特に10%より大となる) は、それぞれダウン、エドワードおよびパトー症候群の発生の兆候である。X-特異的およびY-特異的プローブでのハイブリダイゼーションに続く、シングルX-特異的ドメインを示しY-特異的ドメインを示さない細胞の数の増加は、ターナー症候群の発生の兆候である。2つのX-特異的ドメインおよび1つのY-特異的ドメインを示す頻度の増加はクラインフェルター症候群の兆候であり、1つのX-特異的ドメインおよび2つのY-特異的ドメインを示す細胞の頻度の増加はXYY胎児の兆候である。ハイブリダイゼーションの強さはそれに対しプローブが特異的である標的染色体の数とおおよそ比例するので、間期細胞中でのドメイン計数は、例えば量的蛍光検鏡またはフローサイトメトリを使用したハイブリダイゼーションの強さの計測により補われ (またはときには置き換えられ) る。いくつかの染色体を含む数字で表した異常は、異なる染色体のハイブリダイゼーションを異なる標識手段例えば異なる色で検出することにより同時に記録できる。これらの異常検出手法は、集団中の全ての細胞を記録できるので、手法に必要な大規模な培養の必要性を克服する。これらは数字的異常というハイブリダイゼーション標示の簡単に明確な特質の故に高度に熟練した分析家の必要性を除く。

【0221】数的異常が間期でも検出できるという事実はまた、普通は有糸分裂へと刺激できない細胞の細胞遺

伝学的分析を可能にする。特に、母性抹消血液中に見いだされる胎児細胞の分析を可能とする。このような特性は、羊水穿刺または絨毛生検のような侵略的胎児細胞サンプリングの必要性を除くので有益である。

【0222】背景でも示したごとく、このような胚-侵入的方法が必要な理由は、これまでの核型およびバンド分析は中期の染色体を必要とするということである。いまのところ、中期の染色体を有する細胞の集団を調製するために母性血液から分離した胎児の細胞を培養するための一般に認められた手法はない。本発明の染色試薬は間期核に利用できるという点において、胎児細胞を核型分析する非-胚-侵入的方法が本発明により提供される。

【0223】このような方法における最初のステップは胎盤を通り抜けまたは胎盤から母性血液中に流れ出た胎児細胞を分離することである。母性血液中の胎児細胞の率は非常に低く、細胞数は 10^{-4} から 10^{-6} /mlのオーダーであり、妊娠の時期により非常に変化しやすい。しかしながら、適切にマークされた胎児細胞は母性細胞から区別でき、例えば高速細胞選別により濃縮できる。

【0224】男性胎児の細胞の存在はY染色体に対し染色体-特異的染色試薬による標識、例えば蛍光タグにより同定できる。明らかに母性血液から分離されたリンパ細胞または赤血球前駆体である細胞はY-染色質-陽性であることが示された。[Zillacus et al., Scan. J. Haematol., 15:333(1975); Parks and Herzenberg, Methods in Cell Biology, Vol. 10, pp.277-295(Academic Press, N. Y., 1982) および Siebers et al., Humangenetik, 28:273(1975)]。

【0225】胎児細胞を母性血液から分離する好ましい方法は母性血液には存在しないある成分に対し優先的に親和性を有するモノクローナル抗体の使用である。胎児細胞は父方HLA (ヒト白血球抗体) マーカーまたは胎児細胞の表面上の抗体により検出することもできる。異なるHLAタイプに基づき胎児と母性白血球を区別するための好ましい免疫学的手法はHLA-A2, -A3および-B7遺伝子座、更に好ましくは-A2遺伝子座における差を利用している。更に、第1および第2の三ヶ月期の栄養層は、母性白血球中には存在しない内部細胞を構成するサイトケラチンに対する抗体でマークしてもよい。代表的なモノクローナル抗体は次の参考文献に述べられている。

【0226】ヘルツェンベルグ等[Herzenberg et al., PNAS, 76:1453(1979)]は、明らかにリンパ起源の胎児細胞を、蛍光活性化された細胞選別(FACS)により母性血液から分離することを報告しており、そこでは分離は母性血液中のHLA-A2ネガティブ細胞と結合する標識された抗体の検出に基づいていた。このようなやり方で分離された男性胎児細胞は更にY-染色質のキナクリン染色により同定された。

【0227】コボーン等[Covone et al., Lancet, Oct. 13, 1984:841]はH315と称するモノクローナル抗体を使用

したフローサイトメトリーによる母性血液からの胎児栄養層の回収を報告した。報告によれば、前記モノクローナルは他の栄養層と同じくヒト合胞体栄養細胞の表面に絞り出された糖タンパク質で、抹消血液細胞にはないものであることが同定された。

【0228】カワタ等[Kawata et al., J. Exp. Med., 160:653(1980)]はヒト胎盤の懸濁液から胎盤細胞集団を分離する方法を開示している。この方法は協調した二色および光散乱FACS分析および選別を使用している。5つの異なる細胞集団が、サイズ、ならびにHLA-A, B, Cモノモルフィック決定基(MB40.5)およびヒト栄養層(anti-Trop-1およびanti-Trop-2)に対するモノクローナル抗体により検出された細胞表面抗原の協調表現における量的差異に基づき分離された。

【0229】ロークおよびバターワース[Loke and Butcherworth, J. Cell Sci., 76:189(1985)]は、2つのモノクローナル抗体、18B/A5および18A/C4、を述べており、これらは第1の三ヶ月期の細胞栄養層および合胞体栄養細胞を含む他の胎児上皮組織とよく反応する。

【0230】本発明による染色のために胎児細胞を母性血液から分離するための好ましいモノクローナル抗体は抗-サイトケラチン抗体Cam 5.2であり、これはベクトン-ディキンソン(Becton-Dickinson)(Franklin Lakes, N. J., USA)から商業的に入手可能である。

【0231】胎児細胞を母性血液から分離するための他の好ましいモノクローナル抗体は、1989年8月3日に出願され、「胎児細胞栄養層細胞の分離方法」と題する同時係属出願中で共有の米国特許出願番号第389,224号に開示されたものである[次も参照:Fisher et al., J. Cell Biol., 109(2):891-902(1989)]。そこに開示されたモノクローナル抗体は第1の三ヶ月期のヒト細胞栄養層細胞上の抗原と特に反応するが、その胎児細胞は母性血行に達する蓋然性が最も高い。前記出願および記事はここに特に参考に組み込まれる。簡単に言えば、開示されたモノクローナル抗体は、子宮吸引法により分離された胎盤(placental bed)の切片から得られた細胞栄養層細胞を用いた試験動物の注射により造られた。造られた抗体は、第1の三ヶ月期の羊膜絨毛の細胞栄養層幹細胞層と反応する抗体を選択するためにいくつかの細胞学的スクリーニングを受けた。

【0232】フィッシャー等により開示されたこのような第1の三ヶ月期の細胞栄養層細胞に対する好ましいモノクローナル抗体は、ブダペスト条約に基づきアメリカンタイプカルチャーコレクション[American Type Culture Collection(ATCC;Rockville, MD, USA)]に寄託された次のハイブリドーマから造られたモノクローナル抗体を含んでいる。

【0233】	
ハイブリドーマ	ATCC登録番号
J1D8	HB10096

P185

HB10097

両ハイブリドーマの培養は1989年4月4日にATTCにより受け入れられて1989年4月14日に生育可能と報告された。

【0234】フィッシャー等は前記モノクローナル抗体により母性血液から分離された胎児細胞が試験管内で複製可能であると述べている。従って、フィッシャー等の方法により分離された胎児細胞すなわち第1の三ヶ月期の胎児細胞培養層は、中期および間期における胎児の染色体物質を提供できる。

【0235】胎児細胞、好ましくは白血球および細胞培養層、更に好ましくは細胞培養層は、適切な抗体で一旦マークされてから、直接または好ましくは前記胎児細胞を細胞選別またはパンニング(panning)により分離し濃縮することにより、母性血液から分離される。例えば、FACSは蛍光標識された細胞を分離するのに使用され、またはフローサイトメトリーも使用される。

【0236】母性血液から一旦分離された胎児細胞は、本発明の適切な染色体-特異的染色試薬、好ましくは出生前診断に特に重要なものをもって本発明の方法により染色される。好ましい染色試薬は異数体、例えば染色体タイプ21, 18, 13, XおよびYならびに第21染色体上のサブリジョン21q22のごときこれらの染色体上のサブリジョンを含むいくつかの染色体の何れかの三染色体性、を検出するように造られたものである。

【0237】好ましくは、本発明による染色分析のための胎児サンプルは少なくとも10個の細胞または核、更に好ましくは約100個の細胞または核から成る。

【0238】VII.D. 腫瘍細胞遺伝学

近年の多数の研究は、特定の病気の表現型の診断に役立ちまた病気それ自身の遺伝学的性質への手がかりを提供する、構造的および数値的染色体の異常の存在を明らかにした。著名な例には、慢性骨髄性白血病と第9および第22染色体に伴う転座との密接な関連、13q14の部位の欠失と網膜芽細胞腫との関連および第8および第14染色体に伴う転座とバーキットリンパ腫との関連が含まれる。新種の腫瘍の特異的異常を明らかにする今日の進歩は、細胞遺伝学的分析のための代表的な高品質のバンドド中期スプレッドを造ることの困難性により制限されている。これらの問題は、多くのヒト腫瘍は培養基中で増殖させることが困難または不可能であるという事実に由来する。従って、分裂細胞を得ることは普通は困難である。たとえ細胞が培養基中で増殖できたとしても、増殖する細胞が腫瘍集団を代表するものでないという少なからぬ危険がある。この困難性はまた存在する遺伝学的知識を臨床的診断および予後に応用することを妨げる。

【0239】本発明はこれらの制限を、間期核内の特定の構造的および数値的異常の検出を可能にすることにより克服する。これらの異常は上に述べたごとく検出される。全染色体プローブでのハイブリダイゼーションはこれまでは知られていなかった異常の同定を容易にし、こ

れにより異常と病気の表現型の間の新しい関連の速やかな進展を可能にする。特定の悪性腫瘍の遺伝学的性質が次第によく知られてきているので、遺伝学的障害を標的とするハイブリダイゼーションプローブを選択することにより、間期評価分析はますます具体的に行うことが出来る。選択された染色体上の特定の転座は、びつたりと切断点を側面から攻撃するハイブリダイゼーションプローブの使用により検出できる。これらのプローブの使用は特定の病気の表現型の診断を可能にする。これらは正常では分離されているハイブリダイゼーションドメインを一緒にし、またはハイブリダイゼーションドメインを2つのはっきり分離されたドメインに分離するので、転座は間期において検出できる。これに加えて、これらは治療の途中で悪性細胞の減少および再出現をフォローするために使用できる。このような応用では、存在するかも知れない細胞が少数であり、またそれらは刺激して有糸分裂させることが困難または不可能であるかも知れないので、間期分析が特に重要である。

【0240】重複および欠失、遺伝子増幅およびヘテロ接合度がなくなることに伴うプロセスも、本発明の技法を用いて中期および間期において検出できる。そのようなプロセスは異なる腫瘍の数の増大に関連している。

【0241】V111. 慢性骨髄性白血病(CML)におけるBCR-ABL融合の検出プローブ

このセクションは、本質的に全てのCML患者において融合BCR、ABL配列のわきに位置する第9及び第22染色体からのプローブを用いるFISHに基づくCML試験について詳述する(図8)。このセクションの例において用いられたBCR、ABLプローブは、米国イリノイ州シカゴのユニバーシティオブシカゴメディカルセンターの血液学/腫瘍学セクション、デパートメントオブメディシンのカロル・エイ・ウエストブルックによって好意的に提供された。

【0242】第9染色体上のABLプローブ、c-hu-ABLは、切断が起きるエキソン1Bと11の間のABLの200-kb領域にテロメリックであるように選ばれた35-kbコスミド(pCV105)クローンである(24)。第22染色体上のBCRプローブ、PEM12は、殆ど全てのCML切断点が始まるBCR遺伝子の5.8-kb切断点クラスター領域の部分を含み、かつこれにセントロメリックに延びる18-kbファージクローン(EMBL3内)である。FISHはフルオロクロームテキサスレッドによって検出されるビオチン標識ABLプローブと、グリーンフルオロクロームFITCによって検出できるジゴキシゲン標識BCRプローブを用いて行われた。両プローブのハイブリダイゼーションは、二重バンド通過フィルターセットの付いた蛍光顕微鏡(オメガオプティカル)を用いて同時に観察することができた。

【0243】図8は、第22染色体上のBCR遺伝子、第9染色体上のABL遺伝子、およびフィラデルフィア染色体上のBCR-ABL融合遺伝子の略図であって、CML切断点の位置

とプローブに対する関係を示す。BCR遺伝子のエクソンはソリッド棒で示す。ローマ数字IはBCR遺伝子の第1のエクソンを示し、アラビア数字1-5は、破線で表した切断点クラスター領域内のエクソンを示す。18kbフェージPEM12プローブ(BCRプローブ)の概略の位置は、無地の水平の棒によって示す。CMLにおける切断点の大部分はエクソン2と4との間で起きるので、PEM12に対する15kbまたはそれ以上の標的がフィラデルフィア染色体上に残るであろう。標準的相互転座においては、PEM12に対する数kbの標的(検出できない蛍光シグナル)が派生染色体上に見出されるであろう。マップとエクソンの番号付け(尺度は別として)は、ハイスターカンパ等(前記文献34)から改作した。

【0244】ABL遺伝子のエクソンは、無地の垂直の棒で示す(尺度は別として)。ローマ数字Ia、Ibは択一的に第1のエクソンを、IIは第2のエクソンを示す。エクソンIIは28kbコスミドc-hu-abl(ABLプローブ)の末端の上流約25kbにある。全てのCML切断点は、エクソンIIの上流、通常はエクソンIbとIaの間で、長さ約200kbの領域内で起きる。このため、c-hu-ablは、融合結合から常に25から200kb離れているであろう。マップは(尺度は別として)ハイスターカンパ等(前記文献35)から改作したBCR-ABL融合遺伝子が表示されている。CMLにおいて、PEM12は常に結合に位置するであろうがc-hu-ablはPEM12から25ないし225kb離れているであろう。

【0245】サンプル調製: CML-4:末梢血液を5分間遠心分離した。界面の10滴をPBSで希釈し、攪拌し(spun down)、メタノール/アセティックアシッド(3:1)中で固定し、スライド上に滴下した。CML-2,3,7:凝固を防ぐためにPBSで希釈した5ないし10滴の髄をメタノール/アセティックアシッド中で固定し、スライド上に滴下した。CML-1,4,5,6:末梢血液および/または骨髓を、RPMI 1640中で、10%のウシ胎児血清、抗生混合物(ゲンタマイシン500mg/ml)および1 μ g/ml-グルタミンを補って24時間培養した。培養は、J.J.ユニスおよびM.E.チャンドラー, *Proc. in Clin. Path.*, 7:267(1977)に従ってシンクロナイズさせ、これに続いてギビスおよびジャクソン, *Karyograp.*, 11:91(1985)に従って染色体調製を行った。

【0246】ハイブリダイゼーションおよび検出プロトコル。ハイブリダイゼーションは、D.ピンケル等(27)、トラスク等(25)、およびJ.B.ローレンス等(30)によって記載された手続きを修正して行った後に続いて実施した。BCRプローブは、平均して25%の組み込みを伴ったジゴキシゲニン-11-dUTP(Boehringer Mannheim Biochemicals)を用い、ニックトランスレートされた(Bethesda Research Laboratories Nick-Translation System)。ABLプローブは、同様にビオチン-11-dUTP(Enzo Diagnostics)を用いてニックトランスレートされた。

【0247】1. ハイブリダイゼーション。標的間期細胞および/または中期スプレッドを、ガラススライド上

で72°Cで70%ホルムアミド/2 \times SSC中にpH7で2分間変性する。エタノールシリーズ(70%, 85%, 100%各2分間)中で脱水する。空気乾燥し、37°C(2 \times SSC)は0.3M NaCl/30mMソジウムサイトレート)に置く。各プローブ2ng/ml, 50%ホルムアミド/2 \times SSC, 10%デキストランサルフェート, および1mg/mlヒトゲノムDNA(200-600 bpに音波処理)を含むハイブリダイゼーション混合物10 mlを70°Cに5分間加熱してDNAを変性する。30分間37°Cでインキュベートする。温めたスライド上に置き、20mm \times 20mmのカバースリップで覆い、ラバーセメントでシールし、湿潤室中で37°Cで一晩インキュベートする。カバースリップを取り除き、3回20分間それぞれpH7, 42°Cの50%ホルムアミド/2 \times SSCで、2回20分間それぞれ42°Cの2 \times SSCで洗浄し、最後に室温で4 \times SSCでリンスする。

【0248】2. 結合したプローブの検出: 全てのインキュベーションステップは、約100mlの溶液と共に室温でカバースリップの下で行う。ビオチン化されたABLプローブが先ず検出され、次いでジゴキシゲニン-標識BCRプローブが検出された。

【0249】a. ビオチン化ABLプローブ: 4 \times SSC/1%ウシ血清アルブミン(BSA)により5分間アプレブロックする。テキサスレッド-アビジン(Vector Laboratories Inc., 4 \times SSC/1%BSA中2mg/ml)を45分間施す。4 \times SSCで一回、4 \times SSC/1%トリトン-X100(Sigma)で、さらに再び4 \times SSCでそれぞれ5分間洗浄する。5分間PNM(脱脂ドライミルク5%, ソジウムアジド0.02%を含み、遠心分離により固形物を除いたPN。PNは、0.1MNaH₂PO₄/0.1MNa₂HPO₄, 0.05%NP40, pH8である)中でアプレブロックする。ビオチン化されたヤギ抗-アビジン(Vector Laboratories Inc., PNM中5mg/ml)を45分間施す。PNで2回5分間洗浄する。第2層目のテキサスレッド-アビジン(PNM中2mg/ml)を45分間施す。PNで2回それぞれ5分間洗浄する。

【0250】b. ジゴキシゲニン標識BCRプローブ: PNMで5分間アプレブロックする。ヒツジ抗-ジゴキシゲニン抗体(D. Pepper, Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, INから入手; PNM中15.4mg/ml)を45分間施す。PNで2回それぞれ5分間洗浄する。PNMで5分間アプレブロックする。FITCにより抱合されたウサギ抗-ヒツジ抗体(Organon Teknika-Cappel, PNM中1:50)を45分間施す。2回それぞれ5分間PNで洗浄する。必要により、シグナルは、5分間PNMによりアプレブロックし、かつFITCにより抱合されたヒツジ抗-ウサギIgG抗体(Organon Teknika-Cappel, PNM中1:50)を45分間施すことによって増幅される。PNでリンスする。

【0251】3. 可視化: スライドは、対比染色剤として1mg/ml'4',6'-アミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を含む蛍光アンチフェイド溶液[G.D. Johnson and J.G. Noguera, *J. Immunol. Methods*, 43:349(1981)(前記文献31)]にマウントされ、FITC/テキサス赤色二重バンド通過フィルターセット(Omega Optical)を用い、ツァイスアキシ

オスコープにより検査される。

【0252】ここで試験したBCR-ABL PCRに対して用いられた方法は、CML-3,4と7に対してはヘーゲウィッシュベッカー等によって記載され(前記文献32)、またCML-5と6に対してはコーラー等によって記載された(前記文献33)方法である。

【0253】結果、ABLおよびBCRハイブリダイゼーション座位は、たいていの中期スプレッド中の染色体の両染色分体上に見られた。正常な個体からの中期スプレッドと結合したABLプローブは、9qのテロメア近くにあるが(図9A)、BCRプローブは22q11において結合している(図9B)。正常な間期核へのABLまたはBCRによるハイブリダイゼーションは、典型的には両相同染色体上の標的配列に対応した2つの小さな蛍光点を生じた。これらの点は、二次元的核イメージ内に外見上ランダムに分布しており、通常はよく分離していた。少数の細胞は、2つのダブルットハイブリダイゼーションシグナルを示したが、これはたぶんDNAのこの領域を複製した細胞内の両相同の両姉妹染色分体(すなわち細胞サイクルのS-またはG2-フェイズにおけるそれら)へのハイブリダイゼーションの結果であろう。正常なG1核へのABL(赤色)、BCR(緑色)プローブの二重カラー-FISHは、核の周囲にランダムに分布した2つの赤色(ABL)および緑色(BCR)ハイブリダイゼーションシグナルを生じた。

【0254】CMLの遺伝子再配列は、図8に示すように、異常染色体上、通常はPh¹であるが、に共に、また間期核内に共にプローブと相同なDNA配列を生じる。融合遺伝子中のプローブ結合座位間のゲノム距離は、CML患者間で変わるが、25ないし225kbの範囲であって、単一の白血病クローンの全ての細胞において同一である。間期CML細胞へのABL、BCRプローブによる二重カラーハイブリダイゼーションは、核内にランダムに位置する1つの赤色と1つの緑色のハイブリダイゼーションシグナルと、2色間の分離が1ミクロン以下である1つの赤色-緑色ダブルットシグナル(または非常に近接したハイ

ブリダイゼーションに対する1つの黄色のハイブリダイゼーションシグナル、図10参照)を生じた。ランダムに位置する赤色と緑色のシグナルは、正常染色体上のABL、BCR遺伝子へのハイブリダイゼーションに、また赤色-緑色ダブルットシグナルはBCR-ABL融合遺伝子へのハイブリダイゼーションに起因する。間期マッピングの研究は、分離が250kb以下のDNA配列は間期核においては1ミクロン以下の分離でなければならないことを示唆する(25)。結果として、1ミクロン以上分離した赤色と緑色のハイブリダイゼーションシグナルを示す細胞は、正常であると評価された、というのはこのことはハイブリダイゼーション座位が異なった染色体上にあることと合致するからである。しかしながら、統計的考察によれば、正常細胞のなかには、異常と評価されるのに十分なほど互いに近接した赤色と緑色の点を示すものがあるであろう。この二次元的核分析においては、750個の正常核中の9個が互いに1ミクロン以下の分離の赤色と緑色のハイブリダイゼーションシグナルを示した。かくして、正常細胞の約1%が異常として分類された。

【0255】[表3]は、6人のCML患者からの7個のサンプルに対するハイブリダイゼーションの結果を、慣用のカリオタイプおよびその他の診断結果(PCRおよびサザンブロットデータ)と共に示す。6人の患者全てが、そのなかにはバンド分析によってPh¹陰性であることが見いだされた3人(CML-5,-6および-7)が含まれるが、検査された核の50%以上において分離が1ミクロン以下の赤色-緑色のハイブリダイゼーションシグナルを示した。多くは、融合事象が殆ど全ての細胞で見られた。1患者(CML-7)では、PCR分析は融合遺伝子の存在の検出に失敗し、またバンド分析はフィラデルフィア染色体を現出しなかったにもかかわらず、殆ど全ての細胞に融合シグナルを示した。

【0256】

【表3】

6人のCML患者におけるBCR-ABL再配列の細胞遺伝学的顕微鏡伝送学的蛍光性FISH分析およびその他の分析の概要

患者	細胞遺伝学的	中	蛍光性FISH分析	他の情報
CML-1*	48XX,t(9;22)(q34;q11)	小さな末端動原体型染色体への融合	80%が赤色-緑色融合を示した 100%が赤色-緑色融合を示した 100%が融合不能	BCR-ABL融合陽性 PCRによる
CML-2*	48XX,t(9;22)(q34;q11)	入手不能	80%が赤色-緑色融合を示した 100%が融合不能	BCR-ABL融合陽性 PCRによる
CML-3**	48XX,t(9;22)(q34;q11)	入手不能	75%が赤色-緑色融合を示した 25%が正常に見えた	BCR-ABL融合陽性 PCRによる
CML-4**	48XX,t(9;22)(q34;q11)	入手不能	100%が赤色-緑色融合を示した	BCR-ABL融合陽性 PCRによる
CML-5*	47XX,rob,del(22)(q11)	47染色体、小さな末端動原体型染色体への融合	100%が赤色-緑色融合を示した	BCR-ABL融合陽性 PCRによる
CML-6*	48XXins(22;9)q11;q34;q9	小さな末端動原体型染色体上の間質的赤色-緑色融合	100%が赤色-緑色融合を示した	BCR-ABL融合陽性 PCRによる
CML-7*	48XXt(5;9)(q?;q?)	入手不能	100%が赤色-緑色融合を示した	BCR-ABL融合陽性 PCRによる PCRにより、 FISH分析により 検出されたBCR再配列

臨床データ：*CML、治療を受けていない慢性フェーズ；**CML、トランスクリプトを呈している慢性フェーズ；
*CML、治療を受けていない急性化；**CML、トランスクリプトを呈している急性化；およびCML-3、CML-4
は、それぞれ1人の患者からの骨髄と血液サンプルを示す。

【0257】中期スプレッドへのハイブリダイゼーションは3人の患者（CML-1、-5および-6）について行った。これら全ては、単一の末端動原体型染色体上にごく近接した赤色と緑色のハイブリダイゼーションシグナルを示した。2人の患者において、バンドニングによってt(9;22)(q34;q11)と定められたが、Ph⁺に対して予期されたように、その赤色-緑色の対は小さな末端動原体型染色体

体の長い腕のテロメアにごく近接していた（図9C）。1人の患者（CML-6）は、古典的細胞遺伝学によって、2q11に染色体物質の挿入を有すると考えられた。この患者からの中期スプレッドへの二重カラーハイブリダイゼーションは、小さな染色体内に中心的に位置する赤色-緑色の対を示した（図9D）。この結果は、挿入によるBCR-ABL融合遺伝子の形成と合致する。1人の患者（CML

-1) では、2対の赤色-緑色ダブルレットシグナルが150個中3個(2%)の間期核において見られた。これは、これらの細胞中のダブルPh⁺ (またはダブル融合遺伝子)を示す。このような事象は、25の中期スプレッドの分析に限定されていた標準的細胞遺伝学によっては検出されなかった。付加的Ph⁺の取得は、芽球化に伴う最も頻度の高い細胞遺伝学的事象であつて、その細胞遺伝学的検出によつて、疾患の加速を予告することができるであろう。

【0258】CML派生細胞系K-562の中期スプレッドへのABL、BCRプロローブの同時ハイブリダイゼーションは、単一の末端動原体型染色体の両腕に沿って多くの赤色-緑色ハイブリダイゼーション座位を示した。間期核へのハイブリダイゼーションは、赤色と緑色のシグナルが核の同一領域に局限されていることを示した。このことは、そのらが単一の染色体上に局限されていることと合致する。12から15のハイブリダイゼーション対が各核に見られたが、これはBCR-ABL融合遺伝子の対応した増幅を示す(第9E、9F図参照)。これらの発見は、この細胞系における融合遺伝子の増幅を示す前のサザンブロットデータと合致する(26)。

【0259】要約すれば、7例のCML、4例の正常細胞サンプルに対してABL、BCRプロローブを用い二重カラーFISHを使用する間期細胞の分析は、CMLの日常的診断とこの疾患の臨床的監視に対するこのアプローチの有用性を示唆する。その非常に重要な利点の1つは、個々の間期または中期細胞から24時間以内に遺伝子情報が得られるという能力である。かくして、これは1つの集団の全細胞に適用でき、偶然にまたは培養により、たまたま中期にある細胞に限らない。さらに、遺伝子型分析は、形態学または他のマーカーによつて判断されるように、細胞表現型と関連させることができ、これによってCML遺伝子型をもつ細胞の血統的特異性の研究と、異常をもつ細胞の頻度の評価とを共に可能にする。正常細胞の二次元イメージにおける赤色と緑色のシグナルのランダムな並置は、正常細胞のうち約0.01において起きるが、低頻度の検出限界を示す。この検出限界は、コンピュータ化したイメージ分析を用い、各核内のハイブリダイゼーションシグナルの分離と強度のより完全な定量的測定をすることによって低めることができる。このような分析は、細胞が低頻度にBCR-ABL融合をもつ(例えば軽快化中、骨髄移植後、再発中またはモデルシステムにおいて)患者集団の研究において特に重要であろう。

【0260】また、この試験は、少数の細胞しか必要としないので、分析のために利用できる細胞の数が少ない場合、治療中にCML細胞の検出に対して有利であるべきである。最後に、ハイブリダイゼーションスポットをただ数えるだけで、K562細胞系に対して示したように(図9E)、BCR-ABL融合遺伝子の増幅の検出と定量を可能にする。蛍光強度の定量的測定はこの分析の助けになるであろう。

【0261】IX. 一重鎖核酸プロローブを調製してこれを、二重鎖標的DNAに適用する方法。

一般に一重鎖DNAハイブリダイゼーションプロローブを調製してこれを二重鎖標的DNAに適用する方法は、標的DNAとプロローブDNAの両方を同一の制限エンドヌクレアーゼで処理することとこれに続く制限切断付近での一重鎖のダイジェスションを含んでいる。プロローブはダイジェストされた一重鎖を標識されたヌクレオチドで再合成することにより構成される。標識された鎖は標的DNAのダイジェストされていない一重鎖と本質的に相補的である。標識された一重鎖を含む二重鎖DNA断片はより小さいピースに切断されて変性される。ハイブリダイゼーションプロローブは標識された一重鎖断片を標識されていない断片から分離することにより得られる。

【0262】プロローブで使用するべきDNAは、制限エンドヌクレアーゼで処理されて「付着」端を有する制限断片に構成される。すなわち、制限エンドヌクレアーゼが二重鎖DNAを通して付着切断端を造ることは重要である。適当な制限エンドヌクレアーゼはHind III, Bam HI, Eco RIまたは類似物を含むがこれらに限定されるものではなく、これらは全て商業的に入手可能[例えばPromega Biotec(Madison, WI)またはBoehringer Mannheim(Indianapolis, IN)]である。制限エンドヌクレアーゼを選択する際には、結果として生じる制限断片が利用できるクロニングベクターに直接挿入できるサイズ範囲内となるようにすることが好ましい。適当なクロニングベクターは、pBR322のごときプラスミドおよびラムダファージのごときファージ、これら両方からの商業的に入手可能な種々の派生物[例えばPromega Biotec(Madison, WI)およびBoehringer Mannheim(Indianapolis, IN)]を含んでいた。制限断片の増幅されたコピーは標準的技法[例えばManiatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory, 1982)]を使用して分離される。あるいはまた、ある応用では制限断片は存在する研究所から得られる。例えば、アメリカンタイプカルチャーコレクション(the American Type Culture Collection, Rockville, MD)は、誰でも利用できる、制限断片のヒト染色体-特異的ライブラリーのコレクションを備えている。

【0263】標準的技法に続いて、エキソヌクレアーゼでの制限断片の処理、および標識された前駆体の存在のもとでダイジェストされた鎖を酵素的に再-合成することがなされる。特にジェームズおよびレファックにより開示された技法[James and Jeffak, Anal. Biochem., Vol. 141, pp33-37(1984)]が続いてなされる。よって、この文献は参考文献として取り入れられる。簡単に言えば、制限断片に対しDNA 1マイクログラム当たり約3ユニットのエキソヌクレアーゼIIIが、100mMのNaCl, 50mMのトリス-HCl (pH8.0), 10mMのMgCl₂および1mMのジチオトレイトールよりなる37℃の溶液中で加えられる。ダイジェス

ンはサンプルを60℃で5-10分加熱することにより終了される。ジェームズおよびレファックは、これらの条件は毎分当たり約80-200のヌクレオチドのダイジェクションという結果になると報告している。実際のダイジェクションの率は、DNA基質の源と同様にエキソヌクレアーゼIIIの源およびバッチにより変化する(例えばGuo et al., Nucl. Acids Res., Vol. 10, pg. 2065)。所望の長さの標識された鎖を得るには多少の実験が必要かも知れない。エキソヌクレアーゼIIIは商業的に入手可能(例えば, Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) または Promega Biotec (Madison, WI)) である。また、T4ポリメラーゼ(BRL, Bethesda, MD) もエキソヌクレアーゼおよび再合成ステップの両方のために使用できる。

【0264】エキソヌクレアーゼで処理された制限断片は、標識された前駆体の存在のもとでダイジェストされた鎖を再合成するDNAポリメラーゼのためのプライマー/鋳型として役にたつ。好ましい標識された前駆体は、チミジンの代替物としてのビオチン化されたウラシルである。再合成はDNAポリメラーゼIまたはT4 DNAポリメラーゼを使用して、ランガー等の手法[Langer et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci., Vol. 78, pp. 6633-6637 (1981)]に従ってなされ、この手法はリグビー等[Rigby et al., J. Mol. Biol., Vol. 113, pg. 237 (1977)]により開示された基本的ニックトランスレーション技法の改作物である[例えばDNA 1マイクログラム当たり1ユニットのE. コリポリメラーゼIが、100mMのNaCl, 50mMのトリス-HCl (pH 8.0), 10mMのMgCl₂, 1mMのジチオトレイトールおよび50mMのKClからなる溶液中で37℃でインキュベートされる]。また溶液の中には適切な量のトリフォスフェート前駆体(そのひとつまたはそれ以上は標識されている)も含まれている(例えば各50-100マイクロモル濃度のものを、制限断片1ミリリットル当たり20-50マイクログラム)。これらの条件のもとで、再合成は約40-60分で終わる。

【0265】標識された制限断片は、標識された制限断片の各端の標識された領域が確実に分離されるようにするために、より小さい断片に切断される。(さもないければ、一端の標識された断片は、他端の標識された断片に対する相補的領域を含んだ一重鎖DNAのより大きいピースの一部であるかも知れない。)このようなより小さい断片への切断は標準的技法、例えば音波処理、酵素処理または同様なものの一つ[Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982)]によりなされる。

【0266】標識された制限断片はより小さいピースに適切に切断された後、変性されて一重鎖の標識された断片は標識されない断片から分離される。分離はいくつかの方法でできる。好ましい標識、ビオチンが使用されるときは、好ましい分離方法は標準的なアビジンアフィニティカラムによるものである[例えばBayer and Wilchek, "The Use of the Avidin-Biotin Complex as a Tool

in Molecular Biology", Methods of Biochemical Analysis, Vol. 26, pp. 1-45 (1980) および Manning et al., Biochemistry, Vol. 16, pp. 1364-1370 (1977)]。アビジンは、ガラス、セファロース、アガロースその他同種類のものごと多数の異なる基質に、上記文献に記載されたごとき標準的技法で共有結合される。よって、マンニング等およびバイヤーとウイールチェックの9-16頁は参考文献として取り入れられる。アビジンアフィニティカラムも商業的に入手可能(例えば, Zymed Laboratories, Inc. (South San Francisco, CA)) である。ビオチン化されたプローブは、 Chollet および Kawashima [Chollet and Kawashima, Nucleic Acids Research, Vol. 5, pp. 1529-1541 (1985)] の手法に従ってアビジンカラムから除去される。

【0267】前記標識手法の代替手段が可能である。例えば、プローブに使用されるDNAが制限エンドヌクレアーゼで処理された後、結果として生じた制限断片は2つの部分に分離される。第1の部分は上に述べた処理を受ける。すなわち、DNAの標識された鎖を再合成するための鋳型/プライマーを形成するためにエキソヌクレアーゼで処理される。結果として再合成された制限断片は、それから上述のごとくより小さいピースに切断される。この場合の標識は、ビオチンである必要はない。例えば放射性的標識も使用できる。第2の部分もエキソヌクレアーゼ、好ましくはエキソヌクレアーゼIIIで処理される。しかしながら反応は、各制限断片が親の鎖の長さのおよそ半分の2つの非相補的重鎖ピースに変えられるように完了まで進むようにされる。結果として生じるこれらの一重鎖は、それから標準的技法[例えばManiatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982) pp. 335-339 および Alwine et al., Method in Enzymology, Vol. 68, pp. 220-242 (Academic Press, New York, 1979)]を使用してDBMペーパー(DBM paper)に共有結合される。よって、これらの文献の引用頁は参考文献として取り入れられる。第1の部分の断片は変性されて、共有結合された第2の部分の断片を含むDBMペーパーと結合される。条件は、DBMペーパーに共有結合された相補的鎖に対し標識された鎖のハイブリダイゼーションを可能にするように調整される。第1の部分からの標識されない鎖はペーパーから洗浄される(それらがハイブリダイズすべき相補的鎖はない)。洗浄の後標識された鎖は、例えば加熱により除去され、使用できる状態になる。

【0268】標的DNAにプローブを適用する前に、標的DNAはプローブを構成するのに使用されたと同じ制限エンドヌクレアーゼで処理される。制限エンドヌクレアーゼ処理の後に、標的DNAはエキソヌクレアーゼ、好ましくはエキソヌクレアーゼIIIまたはT4ポリメラーゼで処理される。好ましくは、エキソヌクレアーゼ処理の条件は、造られた一重鎖領域の長さがプローブDNAの長さと

本質的に同じになるように調整される。

【0269】標的DNAに対するプローブのハイブリダイゼーションは、標準的手法〔例えばGall and Pardue, Methods in Enzymology, Vol. 21, pp. 270-480 (1981); Henderson, International Review of Cytology, Vol. 76, pp. 1-46 (1982)およびAngerer et al., in Genetic Engineering: Principles and Methods, Setlow and Hollaender, Eds., Vol. 7, pp. 43-65 (Plenum Press, New York, 1985)〕を使用してなされる。よって、これらの文献はインシトゥハイブリダイゼーションにおける本発明の実施の指針として参考に取り入れられる。簡単に言えば、本発明に従って調製されたプローブは、非特異的結合の減少、プローブされる生物学的構造の無欠性の維持その他ために、いくつかの他の薬剤と組み合わせられる。結果として生じる混合物は、ここではハイブリダイゼーション混合物と呼ぶ。以下に、この方法はヒト第21染色体の染色体-特異的染色に適用される。

【0270】ヒト第21染色体のHind III制限断片は、アメリカンタイプカルチャーコレクション(Rockville, MD)を通じてナショナルラボラトリージーンライブラリープロジェクトから入手可能〔Van Dilla et al., "Human Chromosome-Specific DNA Libraries: Construction and Availability", Biotechnology, Vol. 4, pp. 537-552 (1986)〕である。代わりに、そのような断片は上に引用したファンディラ等、またはフスコ等〔Fusco et al., "Construction of Fifteen Human Chromosome-Specific DNA Libraries from Flow-Purified Chromosomes", Cytogenet Cell Genet., 43:79-86 (1986)〕の開示に従って造ることもできる。

【0271】非反復配列インサートを有するライブラリーからのクローンはベントンおよびデービスの方法〔Benton and Davis, Science, Vol. 196, pp. 180-182 (1977)〕により分離される。簡単に言えば、約1000の組換えファージが第21染色体-特異的ライブラリーからランダムに分離される。これらはニトロセルロースに移されてニックトランスレートされた全ゲノムヒトDNAでプローブされる。

【0272】強いハイブリダイゼーションを示さないクローンのうち、明白な非反復配列DNAを含むおよそ300が抽出される。選択されたクローンが増幅された後、各クローン中の第21染色体インサートは³²P標識されて、第21染色体ライブラリーを構成するのに使われたと同じ酵素すなわちHind IIIでダイジェストされたヒトゲノムDNAのサザンブロット(Southern blots)にハイブリダイズされる。クローンを含む非反復配列はサザン分析の間に単一のバンドを生じるものとして認識される。およそ100のこのようなクローンがプローブDNAの不均一な混合物に対して選択される。非反復配列クローンは増幅され、インサートはHind IIIダイジェクションにより除去されて、インサートはゲル電気泳動によりファージアーム(p

hage arms)から分離される。プローブDNA断片(すなわち非反復配列インサート)はゲルから除去されて上述のようにエキソヌクレアーゼIIIで処理され、続いてビオチン化されたUTP前駆体の存在のもとに再合成される。結果として生じる二重鎖断片は各断片が平均して約1.5-2.0の切断を受けるように音波処理される。結果として生じたピースは変性され、ビオチン化された断片は上述のようにアビジンアフィニティクロマトグラフィにより分離される。

【0273】ヒトリンパ細胞染色体はハーバー等〔Harper et al., Proc. Nat'l Acad. Sci., Vol. 78, pp. 4458-4460 (1981)〕に従って調製される。中期および前期の細胞は燐酸緩衝溶液内で3回洗浄され、メタノール-アセティックアシッド(3:1)中で固定され、清潔にされた顕微鏡スライド上に落された。スライドは-20℃で窒素雰囲気中に貯えられる。

【0274】前期の細胞および/または中期のスプレッドを載せたスライドは窒素から取り出され、RNアーゼで処理(100μg/ml, 37℃で1時間)され、37℃のHind III (10ユニットM, 10mM トリス-HCl, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂および14mMジチオエリトリール, pH7.6)で約1-16時間処理され、上述のようにエキソヌクレアーゼIIIで処理されて、エタノールシリーズ中で脱水される。それからプロテイナーゼKで処理(60ng/ml, 37℃で7.5時間)されて脱水される。プロテイナーゼKの濃度は、細胞の型と酵素のロットに基づいて、染色体の位相顕微鏡による像が乾燥したスライド上に殆ど残らないように調整される。ハイブリダイゼーション混合物は(最終濃度で)、2×SSC (0.15M NaClおよび0.015M ソジウムナイトレート)、10%のデキストランサルフェート、500μg/mlのキャリアDNA(音波処理されたニシン精子DNA)および2.0μg/mlのビオチン-標識されたプローブDNAからなっている。この混合物はガラスのカバースリップの下に3μl/cm²の密度でスライドに適用されてラバーセメントでシールされる。37℃で一晩のインキュベーションの後、スライドは45℃で洗浄(50%ホルムアミド-2×SSC pH7, 3回3分、続いて2×SSC pH7, 5回2分)されて、BN緩衝液(0.1M ソジウムヒカーボネート, 0.05% NP-40, pH8)に浸される。この時点以後、スライドは決して乾燥させてはならない。

【0275】スライドはBN緩衝液から取り出されて、室温で5分間、5%の脱脂粉乳(Carnation)および0.02%のソジウムアジド(プラスチック製カバースリップの下で5μl/cm²)でブロックされる。カバースリップは取り除かれ、余分の液体は手早く排出されて、フルオレセイン-アビジンDCS(5%の粉乳と0.02%のソジウムアジドを有するBN緩衝液内で3μg/ml)が加えられる(5μl/cm²)。同カバースリップは戻されてスライドは37℃で20分間インキュベートされる。それからスライドは3回2分間、それぞれ45℃のBN緩衝液内で洗浄される。ビオチン-結合されたフルオレセインの強さは、ビオチン化されたヤギ抗-

アビジン抗体(5%のヤギ血清と0.02%のソジウムアジドを有するBN緩衝液内で5 μ g/ml)の層を加え、続いて上記と同様に洗浄した後、フルオレセイン-アビジンDCSの別の層を加えることにより増幅される。フルオレセイン-アビジンDCS、ヤギ抗アビジンおよびヤギ血清は全て商業的に入手可能〔例えばVector Laboratories (Burlingame, CA)〕である。BN内での洗浄後、蛍光抗フェード液、p-フェニレンジアミン(カバースリップに関し1.5 μ l/cm²)が観察の前に加えられる。最適の顕微鏡像を得るにはこの層を薄く保持することが重要である。この抗フェード液はフルオレセインの減退を大幅に減少させて5分間までの連続した顕微鏡観察を可能にする。この抗フェード液には、DNA対比染色剤(DAPIまたはプロビジウム アイオダイド)が0.25-0.5 μ g/mlが含まれている。

【0276】赤い蛍光を発するDNA-特異的染料プロビジウムアイオダイド(PI)は、ハイブリダイズされたプロローブと全DNAを同時に観察することを可能にするために使用される。フルオレセインおよびPIは450-490nm (Zeiss filter combination 487709)で励起される。励起波長を546nm (Zeiss filter combination 487715)に増大すればPIのみの観察を可能にする。DAPI、紫外線 (Zeiss filter combination 487701)で励起される青い蛍光のDNA-特異的染色剤は、ビオチン-標識されたものと全DNAが別々に観測される場合に対比染色剤として使用される。中期第21染色体は染色体の本体上に散らばるランダムに位置する黄色のスポットにより検出される。

【0277】

【付言】本発明の以上の実施例の記述は例証および説明の目的で提示された。それらは網羅的であるとか、または本発明を開示されたまさにその形態に限定することを意図するものではなく、上記数示に照らして明らかに多くの変更や変形が可能である。実施例は本発明の原理と実際の適用を最もよく説明し、これによりこの技術に熟練した他の者が本発明を種々の実施例でまた期待される特定の用途適合した種々の変更と共に最もよく利用することが可能となるようにするために、選ばれ記述された。ここに添付する特許請求の範囲により本発明の技術的範を定義することが意図されている。

【0278】ここに引用された全ての文献は参考文献として取り入れられる。

【0279】アメリカ合衆国政府は、同国エネルギー省とユニバーシティ オブ カリフォルニアとの間の、ローレンスリバーモアナショナルラボラトリーの運営のための契約書第W-7405-ENG-48号に従って、本発明における権利を有する。

【図面の簡単な説明】

【図1A】 蛍光顕微鏡に取り付けたTVカメラを用いて得られたヒト中期スプレッドにおけるDAPI染色のバイナリーイメージである。DAPI可視化のために適当なフィルターを用いた。イメージのコンピュータ処理により、選

ばれたしきい値強度以上の全ての部分は白く、残りは黒く示された。

【図1B】 図1Aと同一のヒト中期スプレッドのFITC染色のバイナリーイメージである。このイメージは、図1Aと同様に処理されたが、顕微鏡のフィルターを変えたので、プロローブに付けたFITCがDAPIよりもよく見える。

【図1C】 第21染色体のみのバイナリーイメージであって、図1Bのバイナリーイメージ上の非特異的染色対象物(これらはより小さい)は、標準イメージ処理技術によって除いた。

【図2A】 ヒト中期スプレッドにおけるDAPI染色のカラー写真であって、図1A、図1B、図1Cのコンピュータ処理により生じたバイナリーイメージに示されたスプレッドと同時に準備されハイブリダイズされたものである。

【図2B】 図2Aに示すものと同一のヒト中期スプレッドにおけるDNAプロローブに付けたフルオレセインのカラー写真である。これは、DAPIよりもフルオレセインをエキサイトするために、蛍光顕微鏡のフィルターを変えることによって得られた。この写真は、図1Bのバイナリーイメージと比較できる。

【図3】 図1A、図1B、図1Cおよび図2A、図2Bに示すスプレッドと同時に準備しハイブリダイズしたヒト中期スプレッドの写真である。用いられた手法は、全染色体を染色するためにDAPIの代わりにPI(プロビジウムアイオダイド、propidium iodide)を用いる以外は同一であつた。PIとフルオレセイン染色の両者は同一の顕微鏡フィルターで見ることができる。カラーフィルムを用いたのは、カラーフィルム上でプロビジウムアイオダイド対比染色剤は赤色で現れ、プロローブのフルオレセインは黄色で現れるからである。

【図4A】 ブルースクライブプラスミドにおける第4染色体-特異的ライブラリー(ライブラリー pBS-4)のヒト中期スプレッドへのハイブリダイゼーションを示すが、標識しないヒトゲノムDNAは用いず、かつハイブリダイゼーション混合物は変性後すぐに施した。第4染色体の両方のコピーは、他の染色体より僅かによく輝いて見える。小さな矢は、プロローブによって非染色の領域を示す。図3および以下の残りの図のように、PIは対比染色剤であり、フルオレセインはプロローブを標識するために用いる。

【図4B】 ヒト中期スプレッドへのpBS-4のハイブリダイゼーションを示すが、標識しないヒトゲノムDNAがハイブリダイゼーションの間に用いられた(ゲノムDNAに関しQ=2、Qの意味は後に説明する)。定量的イメージ分析は、第4染色体の単位長さ当りの強度が他の染色体のそれの約20Xであることを示す。第4染色体は黄色であり、他の染色体はプロビジウムアイオダイドのために赤色である。2層のアビジン-フルオレセイン/ソチオサ

イアネートが、正確に測定するために、標的染色体を十分に輝かせる目的で用いられた。しかし、第4染色体は、単一の層を施した後に容易に認識できる。

【図4 C】 図4 Bと同一のスプレッドを示すが、フルオレセインイソチオシアネート蛍光のみを通過させるフィルターを通したものである。

【図4 D】 pBS-4特異的ライブラリーを用いたヒト中期スプレッド中に第4染色体を含む放射-誘発転座（矢印）の検出を示す。コントラスト比は約5Xである。

【図4 E】 正常染色体と、第4および第11染色体の間の（細胞系RS4;11において）転座の結果である2つの派生染色体が、本発明の組成物と方法によって間期核中に検出できることを示す。これらは、3つの別個のドメインのように見える。

【図4 F】 ブルースクライブプラスミド中における第21染色体-特異的ライブラリー（ライブラリー pBS-21）の、トリソミー-21細胞系の中期スプレッドへのハイブリダイゼーションを示す。少量のハイブリダイゼーションが、他の末端動原体型染色体の動原体の近くに見える。

【図4 G】 図4 Fと同様のハイブリダイゼーションであるが、間期核を用いるものを示す。3つの第21染色体ドメインが明かに示されている。

【図4 H】 第4染色体からの120のシングルコピープローブのプールを用いた、ヒト中期スプレッドへのハイブリダイゼーションを示す。第4染色体が矢印によって示されている。

【図5】 ヒトDNAの580kbインサートを含む酵母人工染色体(YAC)クローンの、ヒト中期スプレッドへのハイブリダイゼーションを示す。各染色体第12上(12q21.1において)の黄色のフルオレセインバンドが、プロビジウムアイオダイド対比染色剤に対比して見える。

【図6】 ヒト第19染色体の1つのコピーを含むヒト/ハムスターハイブリッド細胞からのDNAの、ヒト中期スプレッドへのハイブリダイゼーションを示す。写真の中心から少し右寄りに、スプレッド中の他の染色体より輝いている2つの第19染色体がある。

【図7】 本発明のプローブを作るためにポリメラーゼ鎖反応(PCR)を用いる代表的な方法を示し、このプローブは反復配列が減少している。

【図8】 正常な、またCMLの中期および間期核の両方におけるCML切断点および対応した染色パターンへのプローブの位置付けを示す。左側は、第22染色体上のBCR遺伝子、第9染色体のABL遺伝子、およびフィラデルフィア染色体上のBCR-ABL融合遺伝子の図式的表示である。また、CML切断点の位置とプローブに対するそれらの関係も示されている(32)。右は、c-hu-ABLおよびPPM12プローブに対して期待される、正常な、またCMLの中期スプレッドおよび間期核へのハイブリダイゼーションパターンを示す。

【図9 A】 中期スプレッドと間期核における蛍光イン

シトゥハイブリダイゼーション(FISH)を示す。正常な中期スプレッドへのABLのハイブリダイゼーションを示す。ABLシグナルは9qのテロメア部分に局限されている。

【図9 B】 中期スプレッドと間期核における蛍光インシトゥハイブリダイゼーション(FISH)を示す。正常な中期スプレッドへのBCRのハイブリダイゼーションを示す。BCRシグナルは22qの動原体近くに局限されている。

【図9 C】 中期スプレッドと間期核における蛍光インシトゥハイブリダイゼーション(FISH)を示す。46XY,t(9;22)(q34;q11)を伴ったCML患者において、abl染色がフィラデルフィア染色体のテロメア領域に局限されていることを示す。

【図9 D】 中期スプレッドと間期核における蛍光インシトゥハイブリダイゼーション(FISH)を示す。46XYins(22;9)(q11;q34)を伴ったCML患者において、挿入的現象から生じた派生第22染色体上に、abl染色が間質的にあることを示す。

【図9 E】 中期スプレッドと間期核における蛍光インシトゥハイブリダイゼーション(FISH)を示す。K562細胞系が間期核の領域に局限された多数のシグナルを示していることを表している。同一の染色パターンが、BCR-ABL融合遺伝子増幅を示すBCR プローブに伴って見られた。

【図9 F】 中期スプレッドと間期核における蛍光インシトゥハイブリダイゼーション(FISH)を示す。単一の染色体へ局限された融合遺伝子増幅を示すK562細胞系からの中期スプレッドを示す。

【図10】 二重バンド通過フィルターを通して同時に可視化されたABL（赤色）およびBCR（緑色）プローブによるCML間期核における蛍光インシトゥハイブリダイゼーションを示す。CML患者からの細胞は、BCR-ABL融合遺伝子へのハイブリダイゼーションに起因する赤色-緑色（黄色）シグナルと、第22および第9染色体上の正常なBCR、ABL 遺伝子への単一な赤色および緑色ハイブリダイゼーションシグナルとを示している。

【図11 A】 構造的異常検出のための典型的なプローブ戦略における染色体の染色パターンを示す。図示のセクションは、染色体全体を染色するプローブの使用を示す。このようなプローブは、その染色体に沿ってどこかで起きる転座を検出するために用いることができる。図12の写真は、転座を検出するために第22染色体に対するこの染色の使用を示すが、この患者においてはCMLに伴って起きているものである。染色のこのようなアプローチは、染色される核の領域が比較的に大きいので、間期核においては非常に有効であるとはいえず、染色された領域における重複は多くの核において解釈を難しくする。

【図11 B】 構造的異常検出のための典型的なプローブ戦略における染色体の染色パターンを示す。図示のセ

クションは、図11Aで示された染色体の染色領域の切断点近傍の領域への縮小を示し、その領域における事象に焦点を合わせた情報を提供する。染色パターンは、切断点間にわたって連続または不連続であり、このためある結合は切断点の両側にある。このような染色パターンは、ただ1つの「色」のみを必要とするが、他のどのようなゲノム領域が組み換え(exchange)に含まれるかについては何ら情報を与えない。

【図11C】 構造的異常検出のための典型的なプローブ戦略における染色体の染色パターンを示す。図示のセクションは、再配列の結果として共に生じた配列と結合して、中期、間期の細胞中の検出を可能にするプローブの使用を示す。この場合には、異なる配列は異なる「色」で染色される。このような染色パターンは、この出願のセクションVIIIの例において使用されるものである。

【図11D】 構造的異常検出のための典型的なプローブ戦略における染色体の染色パターンを示す。図示のセクションは、再配列に含まれる両切断点の両側の染色を含むことによって、図11Cの延長を示す。示したように、異なる「色」が使用される。より複雑な染色パターンによって供給される追加の情報は、核の解釈の助けとなる。また、そこでの議論のように明白な挿入事象の認識も可能となる。

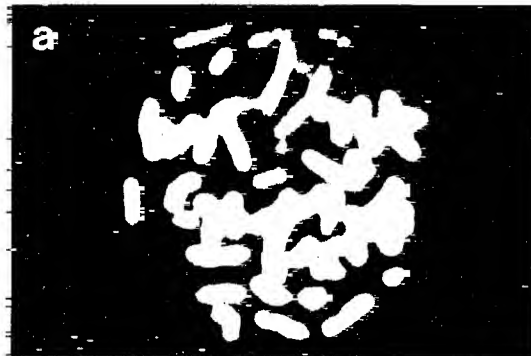
【図11E】 構造的異常検出のための典型的なプロー

ブ戦略における染色体の染色パターンを示す。図示のセクションは、染色体の1つの相同体における挿入の検出を示す。

【図11F】 構造的異常検出のための典型的なプローブ戦略における染色体の染色パターンを示す。図示のセクションは、欠失の検出に有用な染色パターンを示す。欠失は、欠失領域のみを染色するプローブによっても検出できるが、プローブ結合の欠如は、標的配列の欠失以外の理由によるかもしれない。わきに位置する異なった「色」に染色された領域は、ハイブリダイゼーションに対する対照としての役目をする。

【図12】 染色体全体を染色することによる再配列を検出するための染色パターンを示すが、この場合にはCMLと関連した第22染色体の再配列である。この図の中期スプレッドは、ずっと第22染色体に沿って結合したプローブによって染色されたCML細胞からのものである。プローブ-染色された領域は黄色に見える。DNAの残りは赤色-蛍光化学染色プロビジョムアイオタイドによって染色された。全く黄色の染色体は、第22染色体の正常なコピーである。この正常第22染色体のちょうど下にフィラデルフィア染色体、小さな一部黄色で一部赤色の染色体がある。このフィラデルフィア染色体の下右に、第22染色体(黄色)の遠位部分の付いた異常第9染色体(赤色)がある。この図の写真は、図11Aに示した染色パターンを表す。

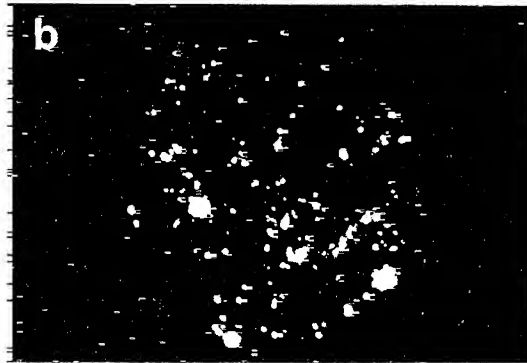
【図1A】



【図4A】



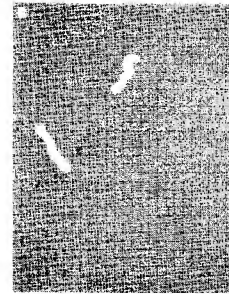
【図1B】



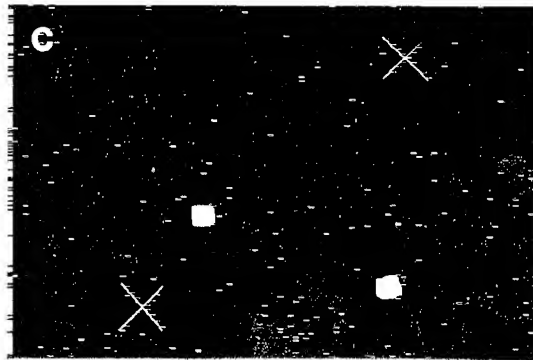
【図4B】



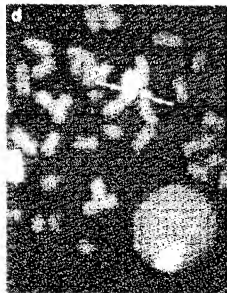
【図4C】



【図1C】



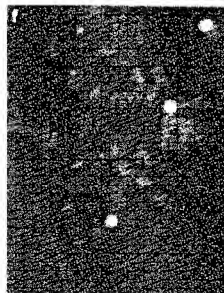
【図4D】



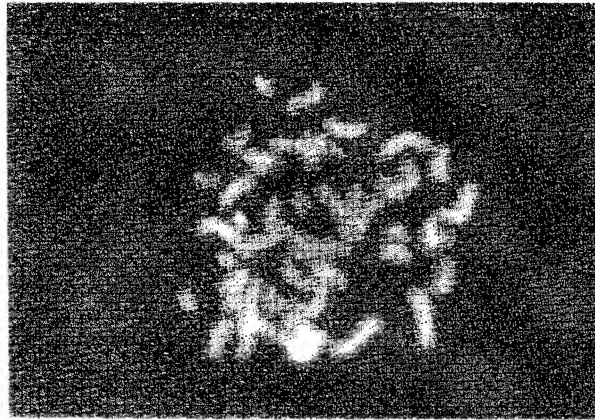
【図4E】



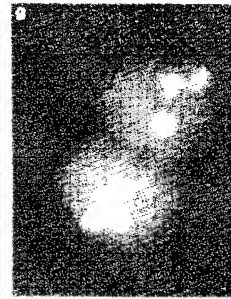
【図4F】



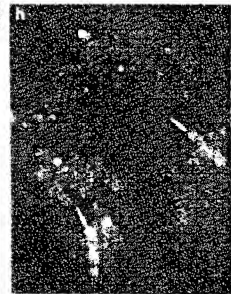
【図2A】



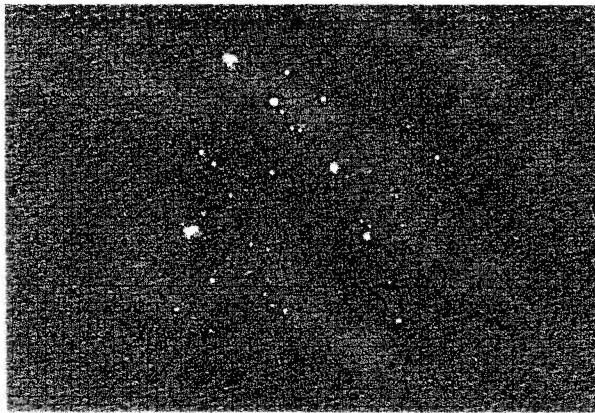
【図4G】



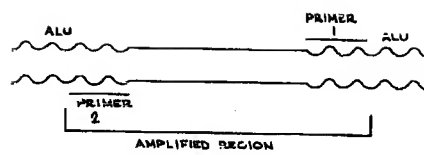
【図4H】



【図2B】

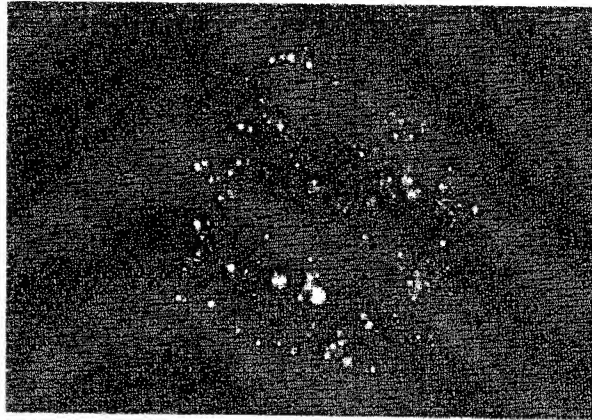


【図7】

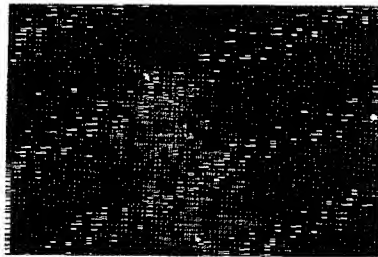


(特7) 103-199564 (P2003-199564A)

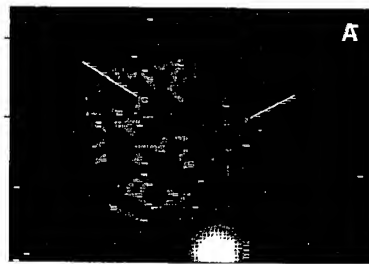
【図3】



【図5】



【図9A】



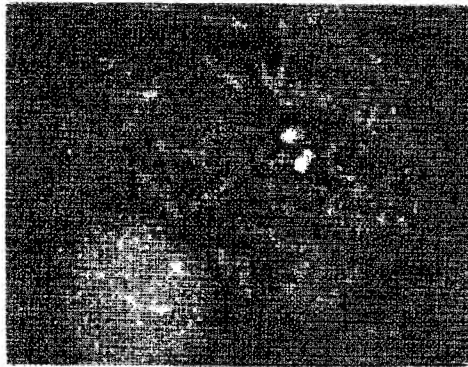
【図9B】



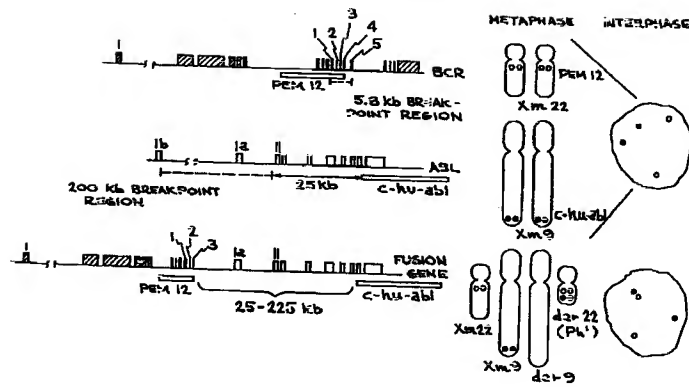
【図9C】



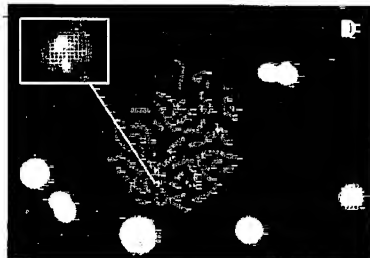
【図6】



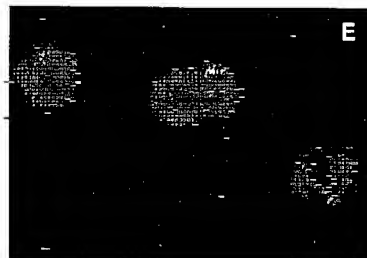
【図8】



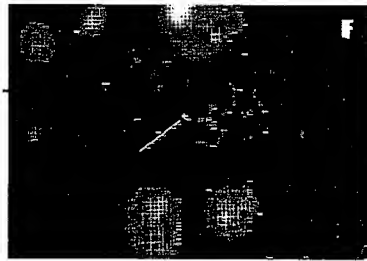
【図9D】



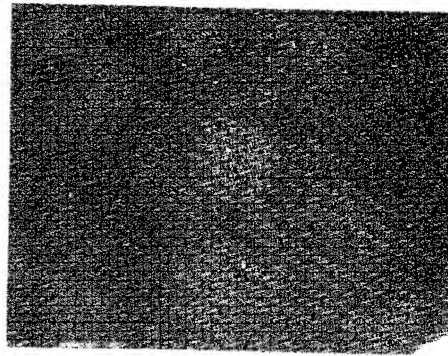
【図9E】



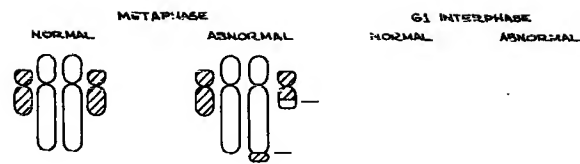
【図9F】



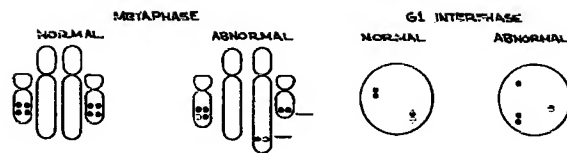
【図10】



【図11A】



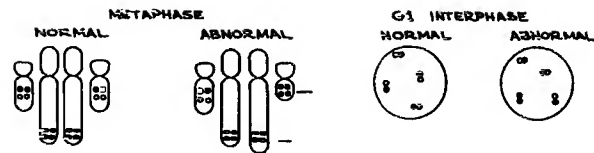
【図11B】



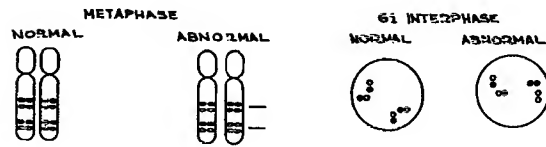
【図11C】



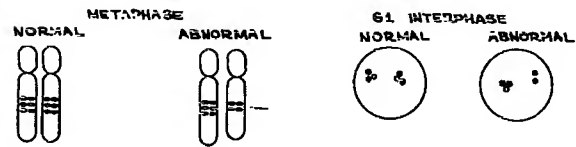
【図11D】



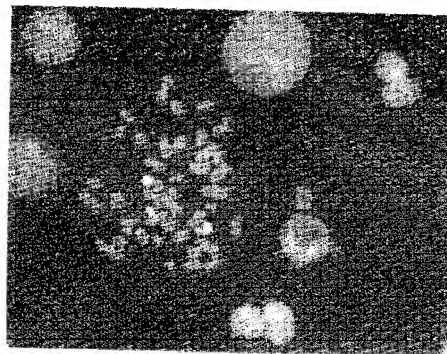
【図11E】



【図11F】



【図12】



(51) 103-199564 (P2003-199564A)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	(参考)
G 0 1 N	33/566	G 0 1 N 33/58	A
	33/58	C 1 2 N 15/00	A
(72)発明者	ジョー ダブリュ. グレイ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94550 リバーモア ロミタス 1760	(72)発明者	ダグラス トカチュク アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94550 リバーモア シェリーストリート 540
(72)発明者	ダニエル ビンケル アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94595 ウォルナット クリーク マンザ ニタコート 31	F ターム(参考)	2G045 BA14 BB14 BB24 BB46 BB50 BB51 CB01 DA13 FA16 FB02 FB07 FB12 GC15 4B024 AA11 CA03 CA09 HA14 4B063 QA12 QA19 QQ04 QQ58 QR56 QS34